



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

ARACELY VIEIRA DE MELO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTINOCICEPTIVA DE *Lactobacillus plantarum* Lp62 EM
MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL**

Vitória da Conquista, BA
2017

ARACELY VIEIRA DE MELO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTINOCICEPTIVA DE *Lactobacillus plantarum* Lp62 EM
MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Regiane Yatsuda
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Co-orientador: Prof. Dr. Celso Gabriel Vinderola
Universidad Nacional del Litoral - UNL

Vitória da Conquista - BA
2017

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – UFBA

Melo, Aracely Vieira de
Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de *Lactobacillus plantarum* Lp62 em modelo experimental animal / Aracely Vieira de Melo.- 2017.
80 f.: il.

Orientadora: Profª. Drª. Regiane Yatsuda.
Co-orientador: Prof. Dr. Celso Gabriel Vinderola.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Biociências, 2017.

1. *Lactobacillus plantarum*. 2. Probióticos. 3. Cacau. I. Universidade Federal da Bahia. II. Yatsuda, Regiane. III. Vinderola, Celso Gabriel. IV. Título.

CDU: 615

ARACELY VIEIRA DE MELO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTINOCICEPTIVA DE *Lactobacillus plantarum* Lp62 EM
MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL**

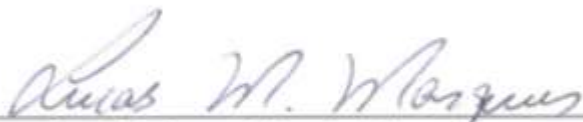
Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista – BA, 10 de outubro de 2017.



Prof.^a Dr.^a Orientadora Regiane Yatsuda
Universidade Federal da Bahia



Prof. Dr. Bruno Lopes Bastos
Universidade Federal da Bahia



Prof. Dr. Lucas Miranda Marques
Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por estar sempre guiando os meus passos e abençoando as minhas escolhas e decisões.

Aos meus pais, **Anselmo** e **Neuda**, e aos meus irmãos, **Neuan** e **Nauan**, por acreditarem em mim e pelo apoio incondicional.

Ao meu namorado, **Neto**, pelo incentivo, apoio, compreensão e cumplicidade. Obrigada por estar sempre ao meu lado e acreditar em mim!

A minha orientadora, **Regiane Yatsuda**, a quem sou extremamente grata por estar concluindo mais essa etapa, obrigada pelo exemplo de comprometimento com a pesquisa, pelas oportunidades, confiança, conhecimento compartilhado e enorme compreensão.

A **Érika**, pela amizade, parceria e imenso auxílio no laboratório. Não seria possível a realização desse trabalho sem a sua ajuda. Você é um exemplo de dedicação com a pesquisa! Obrigada!

A **Manoela**, por ter me acolhido no grupo do leite e me ajudado muito!

A **Gladistone**, pela ajuda na realização desse trabalho, companhia e boas risadas. Obrigada Gladinho!

A **Jeisa**, pela grande amizade, boas conversas e auxílio na reta final desse trabalho.

A **Nayara**, pelas curvas de crescimento realizadas. Obrigada Nay!

As meninas do projeto do leite por todo o esforço e dedicação principalmente na realização dos inoculos e gavagens. Obrigada **Marina, Ana Marta, Dháisa, Beatriz, Erika, Rayra, Thaynara Barros, Mara, Ana Marques, Patrícia, Nayonara, Julian, Thaynara Matos e Ingrid**. A ajuda de vocês foi primordial.

Ao grupo do anti-inflamatório, **Lorena, Rafael, Talita, Carline, Ivo, Verônica, Patrícia, Daniella, Carolina, Alana Caires, Sarah, Alana Prado, Ketleen, Lucas, Paulo Henrique e Mariana**, muito obrigada pelo comprometimento na realização dos experimentos. A ajuda de vocês foi essencial.

A todos os alunos do **projeto**, que contribuíram direto ou indiretamente para a realização desse trabalho.

Ao professor **Lucas**, pela colaboração.

Aos professores do **Biociências**, por compartilhar os seus conhecimentos.

As **instituições de financiamento**, CNPq, FAPESB, CAPES e Programa de Educação Tutorial (MEC/SESU).

*“Quão melhor é adquirir a sabedoria do que o ouro!
E quão mais excelente é adquirir o conhecimento do que a prata!”
Provérbios 16:16.*

RESUMO

MELO, Aracely Vieira. Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de *Lactobacillus plantarum* Lp62 em modelo experimental animal. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2017.

Os efeitos benéficos dos probióticos estão diretamente e exclusivamente relacionados ao tipo de cepa utilizada. Nas últimas décadas, tem havido um número crescente de estudos que visa decifrar os potenciais efeitos benéficos do tratamento com cepas de *Lactobacillus plantarum* na saúde humana, incluindo atividades anti-inflamatória e antinociceptiva. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva da administração oral de *Lactobacillus plantarum* Lp62, isolado da fermentação de amêndoas de cacau, em modelo experimental animal. A avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de *L. plantarum* Lp62 foi realizada através do teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, injeção intraplantar de formalina, recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal e determinação da concentração de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-10). Para todos os testes, foram utilizados três grupos experimentais de camundongos Balb/C: machos adultos tratados por sete dias (MAT), fêmeas tratadas durante a gestação e lactação (FGL) e machos não tratados (MNT) provenientes da ninhada de FGL. Os animais receberam por via oral solução salina a 0,9% ou suspensão bacteriana de Lp62 ($1,44 \times 10^9$ UFC/0,2 mL/diariamente). Os efeitos toxicológicos da cepa Lp62 também foram avaliados. A administração oral de Lp62 demonstrou redução significativa do número de contorções para os três grupos, redução da fase neurogênica em MAT e FGL e redução no recrutamento de neutrófilos em MAT ($p < 0,05$). As FGL e os filhotes apresentaram redução do peso corporal, e do peso dos rins e ovários e útero ($p < 0,05$). Em todos os grupos experimentais, não foram observados macrolesões, mudanças comportamentais e morte. O tratamento oral com *L. plantarum* Lp62 mostrou efeitos antinociceptivos principalmente na fase neurogênica no grupo de animais fêmeas e machos tratados, e redução do edema proveniente de nocicepção neurogênica no grupo de fêmeas tratadas. A atividade anti-inflamatória do micro-organismo também foi observada no grupo de animais machos tratados. Entretanto, os efeitos de *L. plantarum* Lp62 foram menores nos ratos machos adultos não tratados provenientes da ninhada de fêmeas tratadas. Assim, o presente estudo forneceu evidências de que o *L. plantarum* Lp62 apresenta atividade anti-inflamatória e antinociceptiva quando administrado por via oral aos camundongos, e mais estudos devem ser conduzidos para melhor elucidar seu mecanismo de ação e toxicologia.

Palavras-chave: *Lactobacillus*, probióticos, camundongos, nocicepção, inflamação.

ABSTRACT

MELO, Aracely Vieira. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activity of *Lactobacillus plantarum* Lp62 in experimental animal model. Dissertation (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2017.

The beneficial effects of probiotics are directly and exclusively related to the type of strain used. In the last decades, there has been an increasing number of studies aimed at deciphering the potential beneficial effects of treatment with *Lactobacillus plantarum* strains on human health, including anti-inflammatory and antinociceptive activities. In this context, the objective of this study was to evaluate the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the oral administration of *Lactobacillus plantarum* Lp62, isolated from fermentation the cocoa bean in an experimental animal model. The evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of *L. plantarum* Lp62 was performed through the Writhing test induced by acetic acid, intraplantar injection of formalin, neutrophil recruitment to the peritoneal cavity and determination of cytokine concentration (TNF- α , IL-1 β and IL-10). For all tests, three experimental groups of *Balb/C* mice were used: adult males treated for seven days (AMT), females treated during gestation and lactation (FGL), and untreated males (UM) from the litter of FGL. Animals received orally 0.9% saline solution or bacterial suspension of Lp62 (1.44×10^9 CFU/0.2 mL/daily). Toxicological effects of Lp62 were also evaluated. Oral administration of Lp62 showed significant reduction of writhing number for the three groups, reduction in neurogenic phase in AMT and FGL, and reduction in the recruitment of neutrophils in AMT ($p < 0.05$). FGL and the pups showed reduction of body weight, and of kidneys and ovaries plus uterus weight ($p < 0.05$). In all experimental groups, no macrolesions, behavioral changes and death were observed. The oral treatment with *L. plantarum* Lp62 showed antinociceptive effects mainly on the neurogenic phase in females and adult's male group and reduction of edema originating from neurogenic nociception in the group of treated females. The anti-inflammatory activity of the microorganism was also observed in the group of treated male animals. However, the effects of *L. plantarum* Lp62 were lower in the adults male mice untreated from the litter of females treated. Thus, the present study provided evidence that the *L. plantarum* Lp62 has anti-inflammatory and antinociceptive activities when orally administered to the mice, and more studies should be conducted to better elucidate their mechanism of action and toxicology.

Keywords: *Lactobacillus*, probiotics, mice, nociception, inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Grupos experimentais.....	43
--------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SCFAs – Ácidos graxos de cadeia curta
TGI - Trato gastrointestinal
SII - Síndrome do intestino irritável
BAL - Bactérias ácido láticas
GRAS - Geralmente reconhecidas como seguras
FDA - Food and Drug Administration
QPS - Presunção Qualificada de Segurança
EFSA - European Food Safety Authority
pH – Potencial hidrogeniônico
NO - Óxido nítrico
HDL - Lipoproteína de alta densidade
IMC – Índice de massa corporal
IgA – Imunoglobulina A
HMO - Oligossacarídeos do leite humano
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
IL-1 β - Interleucina-1 β
TGF- β – Fator de transformação do crescimento beta
G-CSF - Fator estimulador de colônias de granulócitos
IL-10 - Interleucina 10
Th1 – T helper 1
IL-8 - Interleucina 8
INF- γ – Interferon gamma
IL-6 - Interleucina 6
Th2 – T helper 2
CDs - Células dendríticas
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
GALT - Tecido linfoide associado ao intestino
PPs - Placas de Peyer
MLNs - Linfonodos mesentéricos
GF - Livre de germes
SPF - Livre de patógenos específicos
Treg - T reguladoras
ILFs - Folículos linfoides isolados
TLRs - Receptores Toll-like
IECs - Células epiteliais intestinais
PAMs - Peptídeos antimicrobianos
IELs - Linfócitos intraepiteliais
KGF - Fator de crescimento de queratinócitos
PRRs - receptores de reconhecimento padrão
PAMPs - Padrões moleculares microbianos específicos
IL-12 - Interleucina 12
NK - Natural Killer
NKT - Natural Killer T
NLRs – Receptores Nod-like
ILCs - Células linfóides inatas
APCs - Células apresentadoras de antígenos
NGF - Fator de crescimento nervoso

SNC - Sistema nervoso central
ATP - Trifosfato de adenosina
SP - Substância P
CGRP - Peptídeo relacionado com o gene da calcitonina
GABA - Ácido gama-aminobutírico
NF-kB - Fator nuclear kappa B
IRF - Fator regulador do interferon
PGE2 - Prostaglandina E2
ERO - Espécies reativas de oxigênio
ERN - Espécies reativas de nitrogênio
mRNA – RNA mensageiro
IL-4 - Interleucina 4
MRS - deMan, Rogosa e Sharpe

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Micro-organismos probióticos	15
2.2 Bactérias Ácido-Láticas	16
2.3 <i>Lactobacillus plantarum</i>	18
2.4 Microbiota intestinal	19
2.5 Microbiota intestinal durante a gravidez	20
2.6 Influência do leite materno no estabelecimento da microbiota intestinal.....	22
2.7 Influência da microbiota intestinal infantil na maturação do sistema imunológico	26
2.8 Sistema imunológico da mucosa intestinal	27
2.9 Atividade antinociceptiva	30
2.9.1 Atividade antinociceptiva de probióticos	32
2.10 Atividade anti-inflamatória.....	33
2.10.1 Atividade anti-inflamatória de probióticos	35
3. JUSTIFICATIVA	37
4. OBJETIVOS	40
4.1 Objetivo geral	40
4.2 Objetivos específicos	40
5. METODOLOGIA.....	41
5.1 Animais.....	41
5.2 Micro-organismo Probiótico.....	41
5.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de <i>L. plantarum</i> Lp6 em modelo experimental animal.....	42
5.3.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético	43
5.3.4 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina	44
5.3.5 Recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal	44
5.4 Avaliação da variação do peso corporal das fêmeas tratadas oralmente durante a gestação e lactação com <i>L. plantarum</i> Lp62 e dos seus filhotes não tratados durante o experimento	45
5.5 Avaliação do efeito toxicológico do tratamento oral de <i>L. plantarum</i> Lp62 no modelo experimental animal.....	45
5.6 Análise estatística	46
REFERÊNCIAS	47

CAPÍTULO I: Anti-inflammatory and antinociceptive activity of <i>Lactobacillus plantarum</i> Lp62 in experimental animal model	57
CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
ANEXO	80

1. INTRODUÇÃO

O papel da microbiota na saúde humana e nutrição tem crescido de forma constante na última década. Estudos tem correlacionado a composição da microbiota com o estado de saúde ou doença do hospedeiro (BÄUMLER; SPERANDIO, 2016), pois, sabe-se que, alterações na microbiota intestinal pode influenciar doenças infecciosas e não infecciosas (D'ANGELO; REALE; COSTANTINI, 2017).

A microbiota intestinal protege o hospedeiro de infecção por micro-organismos patogênicos; exerce atividades metabólicas importantes, extraindo energia de polissacarídeos dietéticos indigestíveis, produzindo ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), vitaminas (por exemplo, vitamina K, vitamina B12 e ácido fólico) e aminoácidos que os seres humanos não conseguem produzir; contribui para o desenvolvimento e função do sistema imune do trato gastrointestinal (TGI); desenvolvimento, amadurecimento e manutenção das funções sensoriais e motoras, e da barreira intestinal (GERRITSEN et al., 2011; SASSONE-CORSI; RAFFATELLU, 2015). Entretanto, o estabelecimento de uma microbiota intestinal benéfica não só contribui para a homeostase intestinal, mas também exerce efeitos sistêmicos desejáveis, reduzindo a incidência de certas patologias (FRIEDRICH et al., 2017).

A microbiota intestinal também pode mediar ou modular o desenvolvimento do cérebro através do eixo intestino-cérebro. O processo de colonização microbiana inicia mecanismos de sinalização que afetam os circuitos neuronais envolvidos no controle motor e no comportamento da ansiedade (HEIJTZ et al., 2011). Alterações na interação eixo intestino-cérebro têm sido relacionadas a uma série de distúrbios inflamatórios, autoimunes, neurodegenerativos, metabólicos, de humor, comportamentais, cognitivos, autistas, e relacionados ao estresse e a dor.

Entendendo o papel funcional da comunidade microbiana intestinal na saúde e na doença, a utilização de probióticos torna-se uma alternativa viável para restaurar a saúde de um microbioma alterado (LANE; ZISMAN; SUSKIND, 2017). O efeito terapêutico da suplementação de probióticos foi estudado em diversas doenças, principalmente relacionadas a distúrbios gastrointestinais e metabólicos, onde os resultados têm apoiado o uso potencial de probióticos como agentes terapêuticos (KRISTENSEN et al., 2016).

Probióticos são considerados “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (FAO/OMS, 2001). As cepas pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são as bactérias mais

utilizadas como probióticos (PLAZA-DÍAZ et al., 2017). Formulações probióticas estão sendo desenvolvidas e padronizadas para consumo humano e animal, e os diferentes produtos lácteos, alimentos funcionais, suplementos dietéticos e formulações farmacêuticas contendo cepas probióticas estão sendo destinados com o objetivo de conferir benefícios para a saúde dos seres humanos (ELSHAGHABEE et al., 2017), incluindo a manutenção da função de barreira intestinal (PLAZA-DÍAZ et al., 2017), resistência a colonização de patógenos, controle de distúrbios metabólicos e intestinais inflamatórios, modulação do sistema imunológico (SASSONE-CORSI; RAFFATELLU, 2015), e controle da dor (NOBAEK et al., 2000).

A administração oral de micro-organismos probióticos durante a gravidez e lactação também é uma estratégia eficaz para modular a composição da microbiota e reduzir o risco de infecções e doenças tanto nas mães, quanto nas crianças (BOND; MORRIS; NASSAR, 2017; VICTORA et al., 2016). A transmissão de bactérias da mãe para o recém-nascido através do contato direto com a microbiota materna durante o nascimento e através do leite materno durante a lactação influencia a colonização intestinal da criança, com potenciais consequências para a saúde (SANZ, 2011).

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva da administração oral de *Lactobacillus plantarum* Lp62, isolado da fermentação de amêndoas de cacau, em modelo experimental animal.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Micro-organismos probióticos

O conceito de probiótico data do século passado (1907), quando Elie Metchnikoff (cientista russo galardoado com o Prêmio Nobel, e professor no Instituto Pasteur em Paris) desenvolveu uma dieta com leite fermentado com as bactérias que ele chamou de "Bacilo búlgaro", sugerindo que a dependência dos micro-organismos intestinais sobre os alimentos torna possível adotar medidas para modificar a microbiota e substituir os micro-organismos nocivos por benéficos (FAO/OMS, 2001; GUARNER et al., 2011). Entretanto, o termo probiótico só foi introduzido pela primeira vez, anos depois, em 1965, por Lilly e Stillwell que definiram probióticos como fatores microbianos promotores de crescimento de outros micro-organismos (LILLY; STILLWELL, 1965). Em 1989, Roy Fuller destacou que para ser considerado probiótico, o micro-organismo deve estar presente em um estado viável, e introduziu a ideia do efeito benéfico sobre o hospedeiro (GUARNER et al., 2011). Atualmente, a organização mundial de saúde define probióticos como micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/OMS, 2001).

Os micro-organismos utilizados como probióticos incluem bactérias ácido- lácticas, bactérias não ácido lácticas e leveduras (COPPOLA; TURNES, 2004). As bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os micro-organismos probióticos mais comumente utilizados (GERRITSEN et al., 2011), entretanto, o efeito de uma bactéria é específico para cada cepa, e não pode ser generalizado, inclusive para outras cepas da mesma espécie (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

Os probióticos são utilizados em diversos tipos de alimentos, principalmente nos laticínios, mas também em suplementos nutricionais, em forma de cápsulas ou comprimidos (BINNS, 2014). Dependendo da cepa e do produto, a dose dos probióticos pode variar. Muitos produtos de venda livre fornecem entre 1–10 bilhões de UFC/dose, porém, alguns produtos apresentam melhores efeitos em quantidades maiores ou menores (GUARNER et al., 2011).

Para ser utilizado como probiótico, o micro-organismo precisa ter identificação internacionalmente conhecida (gênero e espécie), não apresentar comportamento patogênico, não possibilitar a transferência de genes de resistência a antibióticos, resistir à acidez gástrica e toxicidade biliar, aderir ao epitélio intestinal, ser capaz de colonizar o trato gastrointestinal,

produzir substâncias antimicrobianas, modular respostas imune, influenciar atividades metabólicas e resistir a processos tecnológicos (DUNNE et al., 2001; PINEIRO; STANTON, 2007)

Os benefícios proporcionados à saúde do hospedeiro através da ingestão de probióticos estão relacionados com a melhoria da função de barreira intestinal através dos efeitos sobre o epitélio e revestimento de muco; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos; diminuição da população de patógenos através da produção de ácidos acético e lático, de bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose; alívio da constipação; aumento da absorção de minerais; produção de vitaminas e estimulação do sistema imune tanto a nível intestinal, quanto sistêmico, bem como em outros sistemas celulares e órgãos, como o fígado e o cérebro (RIJKERS et al., 2010; SAAD, 2006).

Os probióticos podem equilibrar a microbiota intestinal e, portanto, regular a função intestinal adequada e ser eficaz na prevenção ou tratamento de várias doenças gastrointestinais, como diarreia infecciosa, diarreia relacionada a antibióticos, síndrome do intestino irritável (SII), doença de Crohn, intolerância à lactose, alergia alimentar, artrite reumatoide e câncer de cólon (EVIVIE et al., 2017; LINARES et al., 2017).

2.2 Bactérias Ácido-Láticas

As bactérias ácido láticas (BAL) compreendem um grande número de gêneros, incluindo diversas espécies. São bactérias gram-positivas, catalase-negativas, não formadoras de esporos e que geralmente crescem sob condições microaerófilas ou estritamente anaeróbicas (KLEIN et al., 1998). Com base no produto final da sua fermentação, as BAL estão agrupadas como homofermentativas ou heterofermentativas. As homofermentativas produzem ácido lático como principal produto da fermentação da glicose. As heterofermentativas, além do ácido lático, produzem uma série de produtos, incluindo dióxido de carbono, ácido acético, e etanol, a partir da fermentação da glicose (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

Filogeneticamente, apenas bactérias da ordem Lactobacillales são denominadas bactérias do ácido lático, incluindo os gêneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*. No entanto, gêneros mais distantes, compartilham características fisiológicas semelhantes, como as bifidobactérias ou alguns *Bacillus*, que apresentam o ácido lático como principal produto da fermentação, porém, com

metabolismo único e distinto e sem compartilhar nenhuma relação genética com as BAL (SAUER et al., 2017).

As BAL ocupam uma variedade de nichos ecológicos, e muitos deles estão em estreita interação com os seres humanos. Estão presentes em diversos habitats relacionados com alimentos, incluindo plantas, produtos lácteos, leite, vinho e carne e são habitantes naturais de superfícies mucosas de mamíferos, como o TGI, cavidade oral e vagina (ARENA et al., 2017).

As BAL representam coletivamente uma grande parte da microbiota comensal do TGI humano e são frequentemente usadas como probióticos, isoladamente ou em combinação para fermentação de produtos alimentares (CHIANG; PAN, 2012). Os efeitos probióticos atribuídos as BAL e aos produtos lácteos fermentados surgem de micro-organismos inteiros, componentes da parede celular, e de metabólitos como peptídeos e polissacarídeos extracelulares produzidos durante a fermentação (VINDEROLA et al., 2007).

Os microrganismos probióticos são geralmente BAL pertencentes à espécie *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. (para) casei*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. fermentum*, enquanto membros do gênero *Bifidobacterium* também são usados, por exemplo, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. animalis* e *B. breve* (LINARES et al., 2017).

O gênero *Lactobacillus* inclui um grande número de espécies “Geralmente Reconhecidas como Seguras” (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA), e espécies com status de “Presunção Qualificada de Segurança” (QPS) pela European Food Safety Authority (EFSA), e muitas cepas estão entre as bactérias mais importantes na microbiologia alimentar e nutrição humana, devido a sua contribuição para a produção de alimentos fermentados ou seu uso como probióticos (SALVETTI; TOOLE, 2017; SALVETTI; TORRIANI; FELIS, 2012).

Os lactobacilos são bactérias anaeróbicas, crescem a uma temperatura que varia de 2 a 53 °C, faixa de pH entre 3 e 8, sendo a temperatura e o pH de crescimento ideal geralmente entre 30 - 40 °C e pH entre 5.5 - 6.2, respectivamente, e possuem requisitos nutricionais complexos em termos de aminoácidos, peptídeos, vitaminas, sais, ácidos graxos ou ésteres de ácidos graxos (SALVETTI; TORRIANI; FELIS, 2012).

Lactobacilos são parte da microbiota comensal do trato intestinal de humanos e mamíferos e geralmente são reconhecidos como não patogênicos (MOHAMADZADEH et al., 2005), e são importantes para o aumento da imunidade, manutenção do equilíbrio microbiano intestinal e prevenção de infecção gastrointestinal (CHIANG; PAN, 2012). Regulam a resposta imune inata e adaptativa, incluindo a modulação da expressão de citocinas, a maturação de

marcadores de superfície em células imunes, a proliferação de linfócitos e a secreção de anticorpos (DRAKES; BLANCHARD; CZINN, 2004; TSAI et al., 2010).

2.3 *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum é uma espécie de bactéria ácido-lática utilizada como probiótico, e pode ser encontrada em alimentos fermentados, conservas, legumes, carnes, peixes, cereais armazenados e no TGI. É um micro-organismo gram-positivo, microaerófilo, heterofermentativo facultativo, produz acetato e lactato e possui a capacidade de catabolizar a arginina, e produzir óxido nítrico (NO), sendo um micro-organismo inteiramente dependente da disponibilidade de glicose e arginina para seu crescimento (BENGMARK, 1998; BIXQUERT JIMENEZ, 2009). A arginina é um importante doador de óxido nítrico para o TGI, local onde o NO exerce funções importantes como: bacteriostase, secreção de muco, regulação da motilidade e da circulação esplênica, e estimulação das funções imunológicas (BENGMARK, 1998).

A espécie *L. plantarum* possui um dos maiores genomas conhecidos entre bactérias do ácido láctico (CHEVALLIER; HUBERT; KAMMERER, 1994). Kleerebezem et al. (2003), analisou a sequência completa do genoma de *L. plantarum* WCFS1, isolado de uma única colônia de *L. plantarum* NCIMB 8826 da saliva humana, e demonstrou que esse micro-organismo é capaz de crescer em uma grande variedade de fontes de açúcar; possui sistemas de absorção de peptídeos; genes que codificam a biossíntese da maioria dos aminoácidos; apresenta muitas proteínas ancoradas na superfície, o que indica que *L. plantarum* tem potencial para se associar com uma grande variedade de superfícies e substratos potenciais para o crescimento; e um número relativamente elevado de genes que codificam funções reguladoras, o que sugere a capacidade de se adaptar efetivamente a muitas condições ambientais. O grande número de genes que codificam proteínas de superfície (217 proteínas previstas) pode funcionar como reconhecimento ou ligação de certos componentes nos diferentes ambientes, uma vez que vários desses genes mostram homologia com proteínas com funções previstas, tais como, ligação ao muco, promoção da agregação, adesão intercelular, ou aglomeração celular (KLEEREBEZEM et al., 2003).

L. plantarum tem capacidade comprovada para sobreviver ao trânsito gástrico e colonizar o intestino, com uma aparente segurança para o consumidor. Apenas estudos limitados sugerem que algumas cepas podem estar envolvidas na infecção (DE VRIES et al.,

2006), como no estudo em que houve isolamento de cepas de *L. plantarum* na endocardite infecciosa (HARTY et al., 1994). Essas cepas estariam envolvidas na coagulação sanguínea *in vitro* pela agregação de plaquetas humanas, uma possível característica patogênica na progressão dessa doença. Entretanto, Adawi et al. (2002) avaliou a segurança da administração intravenosa de *L. plantarum* DSM 9843 (cepa 299v), utilizando um modelo animal de endocardite, e verificou que após 96h da injeção, não foram encontrados lactobacilos no coração, nem no sangue. Isso demonstrou que mesmo o micro-organismo atravessando a barreira intestinal, não houve bacteremia, o que indica uma segurança na administração dessa cepa.

Em alguns estudos, o consumo de *L. plantarum* mostrou, entre outros efeitos, redução do transporte de enterobactérias fecais, redução de certos fatores de risco para doenças das artérias coronárias e redução dose-dependente nos sintomas da síndrome do intestino irritável (DE VRIES et al., 2006).

2.4 Microbiota intestinal

A microbiota é uma comunidade ecológica de micro-organismos comensais, simbióticos e patogênicos (WANG et al., 2016). A maioria das superfícies internas e externas do corpo de um mamífero (TGI, pele, mucosa oral, entre outras) são fortemente colonizadas por microbiota, com o maior número de organismos concentrados no cólon (GENSOLEN et al., 2016). Os seres humanos e outros mamíferos possuem uma microbiota gastrointestinal complexa que inclui os três domínios de vida (*Archaea*, *Bacteria* e *Eucarya*) (DONALDSON; LEE; MAZMANIAN, 2015). A microbiota intestinal apresenta aproximadamente 10 vezes mais células bacterianas do que o número total de células humanas, e o microbioma intestinal contém 100 vezes mais o número de genes do que o nosso genoma (BÄCKHED et al., 2005).

O desenvolvimento da microbiota não tem início a partir do nascimento como se pensava, alguns estudos já detectaram a presença de micro-organismos na placenta e no mecônio, por exemplo (AAGAARD et al., 2014; HU et al., 2013; RODRÍGUEZ et al., 2015). Logo após o nascimento, o intestino humano é rapidamente colonizado por diversos micro-organismos, e os fatores que influenciam essa colonização estão relacionados com a idade gestacional, genética do hospedeiro, o tipo de parto (vaginal ou cesárea), dieta (leite materno ou fórmula), condições sanitárias, ambiente circundante, hospitalização e tratamento antibiótico (ADLERBERTH; WOLD, 2009; MARQUES et al., 2010; RODRÍGUEZ et al., 2015).

A microbiota intestinal inicial é caracterizada por baixa diversidade. Os primeiros colonizadores que a compõem são anaeróbios facultativos, pertencentes aos filos Proteobacteria e Actinobacteria, que criam um novo ambiente, possibilitando a colonização de anaeróbios estritos como *Bacteroides*, *Clostridium* e *Bifidobacterium* spp. (BÄCKHED, 2011; RODRÍGUEZ et al., 2015). Durante o primeiro ano de vida, a composição da microbiota é altamente variável (PALMER et al., 2007), e evolui por volta dos três anos de idade, dominada pelos filos Bacteroidetes e Firmicutes, para uma configuração adulta (VOREADES; KOZIL; WEIR, 2014; YATSUNENKO et al., 2012).

A microbiota proporciona efeitos benéficos para o hospedeiro através de funções fisiológicas, como a renovação das células epiteliais intestinais, regulação da função da barreira intestinal (NATIVIDAD; VERDU, 2013), ação sobre o metabolismo energético (BESTEN et al., 2013; LEBLANC et al., 2017), síntese de vitaminas, (LEBLANC et al., 2017), proteção contra patógenos (BÄUMLER; SPERANDIO, 2016) e influência no desenvolvimento e modulação do sistema imunológico do hospedeiro (GENSOLLEN et al., 2016).

Uma vez estabelecido, a composição da microbiota intestinal é relativamente estável ao longo da vida adulta, mas pode ser alterada como resultado de infecções bacterianas, tratamento antibiótico, estilo de vida, cirurgia, e mudança de dieta a longo prazo (RODRÍGUEZ et al., 2015). Alterações das interações microbianas com o hospedeiro afetam tanto a função de barreira intestinal, quanto o sistema imunológico local, causando desequilíbrio da homeostase intestinal e favorecendo o desenvolvimento de distúrbios gastrointestinais, doenças autoimunes, doenças metabólicas e distúrbios neurológicos, (FUJIO-VEJAR et al., 2017; JANDHYALA et al., 2015) o que demonstra que, enquanto a simbiose da microbiota intestinal mantém uma fisiologia normal no hospedeiro, a disbiose, composição microbiana alterada, muda o equilíbrio e induz o desenvolvimento de doenças. (THURSBY; JUGE, 2017; WANG et al., 2016).

2.5 Microbiota intestinal durante a gravidez

Os estados de saúde adversos durante a gravidez podem estar associados a alterações microbianas intestinais (SOHN; UNDERWOOD, 2017). Santacruz et al. (2010) relacionaram a composição da microbiota intestinal ao peso corporal, ganho de peso e biomarcadores metabólicos durante a gravidez, apresentando como resultados a redução do número de *Bifidobacterium* e *Bacteroides* e aumento do número de *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae* e *Escherichia coli* em mulheres grávidas com excesso de peso em comparação com as de peso

normal. Relacionou ainda o aumento dos números de *Bacteroides* ao aumento dos níveis de colesterol HDL e ácido fólico e níveis reduzidos de triglicerídeos, o aumento do número de *Bifidobacterium* ao aumento dos níveis de ácido fólico, e os números aumentados de *Enterobacteriaceae* e *E. coli* ao aumento da ferritina e redução da transferrina, enquanto os níveis de *Bifidobacterium* mostraram tendência inversa.

Koren et al. (2012) mostraram que a gravidez está associada a uma profunda alteração da microbiota intestinal, principalmente durante o terceiro trimestre da gravidez, com o aumento do número de proteobactérias que tem sido associada a condições inflamatórias. Nesse mesmo trabalho, os autores transferiram microbiota do terceiro trimestre de gravidez para camundongos livres de germes e evidenciaram que essa microbiota induziu maior adiposidade, insensibilidade à insulina e inflamação quando comparada com a microbiota do primeiro trimestre de gravidez

Além das alterações associadas a saúde materna, o microbioma materno também afeta o microbioma infantil. Collado et al. (2010) demonstraram que concentrações de *Bacteroides* e *Staphylococcus* fecais foram significativamente maiores em lactentes de mães com excesso de peso durante os primeiros 6 meses de vida, e relacionou o aumento de peso e IMC das mães a maiores concentrações de *Bacteroides*, *Clostridium* e *Staphylococcus* e menores concentrações de *Bifidobacterium*. Penders et al. (2007) relacionaram a colonização de bactérias intestinais no primeiro mês de vida de lactentes com o desenvolvimento de manifestações atópicas nos primeiros 2 anos de vida, associando a colonização por *E. coli* e *C. difficile* com o estabelecimento das doenças atópicas.

Um meio proposto para modular a infecção materna ou processos inflamatórios, melhorar distúrbios metabólicos, e para apoiar o desenvolvimento imune da criança, tem sido o uso de bactérias probióticas durante a gravidez e o pós-parto (BOND; MORRIS; NASSAR, 2017; ILMONEN et al., 2011).

Estudo realizado por Arroyo et al. (2010) comparou a administração de cepas probióticas de lactobacilos isoladas do leite materno (*L. fermentum* CECT5716 ou *L. salivarius* CECT5713) com antibioticoterapia a mulheres com mastite infecciosa, concluindo que as mulheres que receberam os grupos probióticos melhoraram e tiveram menor recorrência de mastite quando comparadas com o grupo que recebeu antibióticos. Outro estudo realizado com 256 mulheres saudáveis grávidas tratadas até o final da amamentação (6 meses) mostrou que as intervenções alimentares associada a probióticos (*Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103 e *Bifidobacterium lactis*) diminuiu a circunferência da cintura pós-parto, sugerindo o uso de

probióticos como um meio inovador para a prevenção e tratamento da obesidade (ILMONEN et al., 2011). Bertelsen et al. (2014) avaliaram o consumo de produtos lácteos probióticos, contendo as cepas *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium lactis* Bb12 e *L. rhamnosus* (LGG), durante a gravidez, e associaram o consumo desses probióticos ao risco reduzido de eczema atópico em lactentes aos 6 meses e rinoconjuntivite entre 18 e 36 meses, quando comparado com mulheres que não utilizaram probióticos durante a gestação. Uma redução significativa do risco de eczema atópico em crianças de 2 a 7 anos pela administração de probióticos durante a gravidez também foi demonstrado em um estudo de meta-análise (DOEGE et al., 2012).

2.6 Influência do leite materno no estabelecimento da microbiota intestinal

As fontes predominantes de micro-organismos para a colonização inicial do TGI após o nascimento são a microbiota materna, especialmente durante o parto vaginal, e a dieta da criança, leite materno ou fórmula (WALL et al., 2009).

Bactérias também foram detectadas em corioâmnio e líquido amniótico de mulheres grávidas e no sangue do cordão umbilical obtido de recém nascidos saudáveis, quer por parto vaginal ou por cesariana, sugerindo que a colonização ocorre na pele fetal e no aparelho digestivo no útero (AAGAARD et al., 2014; BEARFIELD et al., 2002; JIMENEZ et al., 2005, 2008a). No entanto, a maioria dos estudos apoiam que a transferência de lactobacilos da mãe para os filhotes ocorre do TGI materno para o leite humano (ABRAHAMSSON et al., 2009; ARROYO et al., 2010; JIMÉNEZ et al., 2008), e do leite para o TGI neonatal (JIMENEZ et al., 2008b; MARTIN et al., 2012). Assim, não está claro quando o efeito benéfico do micro-organismo no início da vida dos bebês pode ocorrer, no feto, no útero, ou durante os períodos neonatal e de lactação (KARLSSON et al., 2011). Langa (2006) informou que as taxas de translocação de algumas bactérias do ácido láctico são 0.002-0.009% após 2 horas. A microbiota mamária começa a desenvolver-se durante o último terço da gravidez, atinge a maior complexidade no final desse período, permanece bem constante ao longo da lactação, diminui acentuadamente ao desmame e desaparece na involução mamária (FERNÁNDEZ et al., 2012).

A Organização Mundial de Saúde afirma que o aleitamento materno é a melhor forma de proporcionar as crianças os nutrientes de que necessitam para um crescimento e desenvolvimento saudável, e recomenda essa prática de forma exclusiva até os 6 meses de idade (BOND; MORRIS; NASSAR, 2017). O leite materno é um fluido complexo, que contém

proteínas, lipídios, carboidratos, além de outros componentes biologicamente ativos. Contém também um microbioma diversificado, e uma população de células epiteliais e células-tronco (WITKOWSKA-ZIMNY; KAMINSKA-EL-HASSAN, 2017). O leite materno fornece componentes bioativos como anticorpos secretores, glicanos, lactoferrina, leucócitos, citocinas e outros fatores produzidos pelo sistema imune inato e adquirido da mãe, conferindo ação anti-infecciosa, anti-inflamatória, e estimulando a maturação do TGI e do sistema imunológico do bebê (MORROW; RANGEL, 2004).

A imunoglobulina A secretora (IgA), forma predominante de anticorpos no leite humano, tem um papel importante na prevenção da ligação de enteropatógenos ao epitélio intestinal de lactentes, liga-se aos agentes patogênicos bloqueando a infecção sem estimular uma resposta inflamatória significativa (CACHO; LAWRENCE, 2017; MORROW; RANGEL, 2004). Os oligossacarídeos do leite humano (HMO) são os glicanos predominantes e são importantes nutrientes. Eles funcionam na ligação direta a patógenos e como prebióticos facilitando o estabelecimento de um microbioma infantil saudável (CACHO; LAWRENCE, 2017). Newburg & Morelli (2015) afirmaram que oligossacarídeos fucosilados dominantes no leite humano são prebióticos e estimulam especificamente o crescimento de bifidobactérias e bacteroides. Os autores também demonstraram que *B. longum* JCM7007 e *B. infantis* ATCC15697 consumiram eficientemente componentes de HMO e produziram lactato abundante e ácidos graxos de cadeia curta, ressaltando que os produtos da fermentação mutualista inibem patógenos e oportunistas.

A lactoferrina é uma glicoproteína abundante no colostro e no leite, apresenta múltiplas funções na defesa do hospedeiro através da ligação ao ferro: propriedades antimicrobianas, inibição do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β), estimulando a atividade, maturação de linfócitos e contribuindo para um meio antioxidante (CACHO; LAWRENCE, 2017; MORROW; RANGEL, 2004). Os leucócitos fornecem principalmente imunidade ativa, combatendo patógenos diretamente por fagocitose, e promovem o desenvolvimento do sistema imunológico do recém-nascido, mas também é provável que protejam a glândula mamária contra infecções (WITKOWSKA-ZIMNY; KAMINSKA-EL-HASSAN, 2017).

As citocinas presentes no leite materno podem atravessar a barreira intestinal e se comunicar com células para influenciar a atividade imune. A família TGF- β são as citocinas mais abundantes do leite humano, regulam a inflamação, o reparo de feridas, ajuda a prevenir doenças alérgicas, e estimula a produção de IgA em recém-nascidos. O fator estimulador de

colônias de granulócitos (G-CSF) atua na superfície intestinal, aumentando as vilosidades, a profundidade da cripta e a proliferação celular. IL-10 é uma citocina reguladora da resposta celular, suprime a resposta Th1 e aumenta a sobrevivência e proliferação de células B. Citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-8 e IFN- γ também são encontradas no leite materno, geralmente em baixos níveis que ainda decaem durante a lactação. IFN- γ melhora a resposta Th1/inflamatória ao mesmo tempo que suprime a resposta Th2/alérgica. TNF- α está envolvida em inflamações sistêmicas e desempenham funções imunológicas na glândula mamária e no lactente. A IL-8 é um importante componente da resposta inflamatória e da resposta inata, pois é uma citocina quimiotática de neutrófilos. IL-6 por sua vez, é uma citocina pró-inflamatória e anti-inflamatória, associada à inflamação sistêmica e febre, e é capaz de promover a diferenciação de células B para produção de anticorpos (AGARWAL et al., 2011; BALLARD; MORROW, 2013; GAROFALO, 2010).

O leite materno também apresenta um microbioma diversificado, que se presume colonizar o TGI infantil (WITKOWSKA-ZIMNY; KAMINSKA-EL-HASSAN, 2017). De acordo com Donaldson; Lee & Mazmanian (2016), a dieta é importante no estabelecimento da composição microbiana no intestino, o que pode ser evidenciado pela observação de que a transição para alimentos sólidos nas crianças coincide com o estabelecimento de uma microbiota semelhante à encontrada em adultos.

O colostro e o leite materno são fontes contínuas de bactérias comensais, mutualistas e potencialmente probióticas para o intestino do bebê (FERNÁNDEZ et al., 2012). Uma criança que consome aproximadamente 800 mL de leite materno por dia ingere entre 8×10^4 - 8×10^6 bactérias comensais (HEIKKILÄ; SARIS, 2003). Estudos demonstram que os gêneros *Streptococcus* e *Staphylococcus* são os grupos bacterianos mais frequentemente isolados e abundantes em amostras de leite, contudo, bactérias probióticas intestinais como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, também são isoladas (FITZSTEVENS et al., 2016). Martin et al. (2012) com o objetivo de avaliar o compartilhamento de cepas bacterianas entre mães e filhos confirmou a presença das mesmas cepas específicas de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Staphylococcus* no leite materno e em amostras fecais infantis, indicando que a amamentação pode contribuir para a transferência bacteriana da mãe para o bebê e, portanto, para a colonização intestinal infantil. Wang et al. (2017) também demonstraram que bactérias típicas intestinais detectáveis no leite materno humano estão vivas e podem colonizar de forma estável o intestino de camundongos livres de germes (Germ free - GF).

A translocação bacteriana da microbiota intestinal para a glândula mamária, uma rota entero-mamária, foi verificada após a administração oral de cepas de *Lactobacillus* isoladas como alternativa para o tratamento de mastite infecciosa durante a lactação, levando a transferência bacteriana do intestino materno para a glândula mamária, uma vez que tais cepas foram isoladas alguns dias depois no leite (ARROYO et al., 2010; JIMÉNEZ et al., 2008).

Acredita-se que o mecanismo de translocação bacteriana envolve células dendríticas (CDs) e células CD18+, incluindo macrófagos, que seriam capazes de capturar as bactérias não patogênicas do lúmen intestinal e, posteriormente, levá-las para outros locais, incluindo a glândula mamária (FERNÁNDEZ et al., 2012; LANGA et al., 2012; RODRÍGUEZ, 2014; VAZQUEZ-TORRES et al., 1999). Destaca-se ainda, a existência de um importante efluxo de células imunes intestinais para as glândulas mamárias durante o final da gravidez e na lactação e que, de fato, a existência de uma circulação entero-mamária de células produtoras de IgA já é conhecida (MORROW; RANGEL, 2004; NEWBOURG, 2005).

Rescigno et al. (2001) demonstraram que as DCs abrem junções de oclusão entre as células epiteliais para apresentar bactérias fora do epitélio, preservando a integridade da barreira epitelial através da expressão de proteínas de junção de oclusão como a ocludina, claudina 1 e zona ocludente 1. DCs intestinais podem reter um pequeno número de bactérias comensais vivas durante vários dias nos linfonodos mesentéricos (MACPHERSON; UHR, 2004). Uma vez dentro das DCs e/ou macrófagos, bactérias intestinais podem se espalhar para outros locais, pois existe uma circulação de linfócitos dentro do sistema linfoide associado à mucosa (FERNÁNDEZ et al., 2012). Perez et al. (2007) mostraram que a translocação bacteriana do intestino para os linfonodos mesentéricos e a glândula mamária ocorreu durante o final da gravidez e na lactação em camundongos. Esse estudo ainda revelou que as células do leite materno humano contêm uma variedade de sequências de DNA bacteriano que também são encontrados nas células mononucleares do sangue periférico materno, e que essas células apresentaram maior biodiversidade quando comparado com o controle, sugerindo que os componentes bacterianos derivados do intestino são transportados para a mama em lactação dentro de células mononucleares. A análise do genoma da cepa de *L. salivarius* CECT 5713 revelou vários determinantes que podem promover interações específicas com DCs, sendo também isolados do leite materno, sugerindo que pelo menos algumas bactérias ácido lácticas presentes no intestino materno podem atingir as superfícies das mucosas da glândula mamária em lactação (LANGA et al., 2012).

Dos Santos et al. (2016) investigaram o efeito do agrupamento de *L. fermentum* e *L. plantarum*, incluindo *L. plantarum* Lp62, obtidas a partir da fermentação do cacau em um modelo de colite experimental, e observou uma redução do número total de leucócitos sanguíneos, principalmente neutrófilos e monócito, redução da produção de IFN- γ , e aumento na concentração de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, que age modulando a resposta inflamatória e restaurando a tolerância aos antígenos luminal (LAMMERS et al., 2003). A IL-10 desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase, suprime a inflamação (KOLE; MALOY, 2014), e pode ser responsável pela redução dos sintomas de cólica nos bebês. Estudo anterior realizado por Messias (2017) avaliaram se a administração diária oral de *L. plantarum* Lp62 em ratas Wistar, sete dias antes do parto e durante 20 dias de lactação (dose de $1,44 \times 10^9$ UFC/rata), afetaria o perfil e a composição das citocinas e composição do leite materno e o peso corporal dos filhotes. O tratamento das ratas durante a gravidez e a lactação com *L. plantarum* Lp62 mostrou aumento do teor nutricional do leite (proteínas, triglicerídeos e colesterol), enquanto diminui o teor de TNF- α , provavelmente contribuindo para o maior peso dos filhotes, o que suporta o potencial de *L. plantarum* Lp62 como um probiótico.

2.7 Influência da microbiota intestinal infantil na maturação do sistema imunológico

Após o nascimento, o sistema imunológico do recém-nascido não é totalmente maduro (BINNS, 2014), entretanto, o contato com micro-organismos, influenciam o desenvolvimento e a maturação desse sistema (SOMMER; BÄCKHED, 2013).

A maturação do tecido linfóide associado ao intestino (GALT), incluindo o aumento do tamanho do tecido e o desenvolvimento de centros germinativos (sítios de proliferação de células B, diferenciação e hipermutação somática nos gânglios linfáticos) depende da colonização microbiana pós-natal (SOMMER; BÄCKHED, 2013). Animais livres de germes (GF) apresentam déficits extensivos no desenvolvimento do GALT, poucas e menores placas de Peyer (PP) e linfonodos mesentéricos (MLNs), em comparação com animais alojados em condições livre de patógenos específicos (SPF) (ROUND; MAZMANIAN, 2009). Além disso, animais livres de germes também apresentam área de superfície intestinal reduzida, diminuição do volume de células epiteliais e menor espessura das vilosidades (DI MAURO et al., 2013).

Bouskra et al. (2008) demonstraram que animais GF apresentam comprometimento do desenvolvimento e maturação de folículos linfóides isolados (ILFs). Ostman et al. (2006) estudaram o papel da microbiota comensal para o desenvolvimento e função de células T

reguladoras (Treg) e observou uma diminuição da população e da função dessas células em animais GF quando comparados com animais convencionais. A expressão e a localização dos receptores de reconhecimento padrão (receptores tipo Toll, TLRs) pelo epitélio são influenciadas pela colonização bacteriana do intestino e a expressão de defensinas e outras proteínas antimicrobianas são deficientes em animais GF (ROUND; MAZMANIAN, 2009).

A colonização microbiana no início da vida marca um período de tempo limitado em que o sistema imunológico é permissivo para a instrução microbiana. Evidências sugerem que as influências imunes induzidas pela microbiota durante esse período podem ser duráveis, criando oportunidades para que se desenvolva uma resposta imune adequada, ou imprópria, e uma resistência, ou susceptibilidade, à doença na vida adulta. A composição da microbiota de um adulto pode, portanto, refletir em parte o histórico de exposição a micro-organismos no início da vida (GENSOLLEN et al., 2016). Hansen et al. (2012), avaliaram a colonização de camundongos GF inoculados na terceira semana de idade com microbiota cecal de camundongos SPF, e observaram um estado pró-inflamatório com produção elevada de IL-12, TNF- α , IFN- γ e IL-6 quando comparados com camundongos SPF. Avaliaram também uma população de células mononucleares sistêmicas (NK, NKT, TCD4+ com marcadores regulatórios e TCD4+ produtoras de IFN- γ) em animais GF com uma ou três semanas de nascimento co-habitados com animais SPF, e detectaram aumento dessas células no baço desses animais quando comparados com animais SPF. A expressão gênica de vários receptores e citocinas reguladoras da imunidade também diminuiu em camundongos GF e colonizados com uma ou três semanas de idade em comparação com camundongos SPF. Portanto, o período pós-natal é um ponto crítico para a aquisição de uma microbiota intestinal adequada e oferece uma ferramenta para direcionar o desenvolvimento do sistema imunológico neste período de tempo (HANSEN; METZDORFF; HANSEN, 2013).

A falta de exposição microbiana devido às condições altamente higiênicas encontradas no mundo ocidental impede a maturação adequada do sistema imunológico e predispõe indivíduos a alergias e possivelmente a outras doenças. A administração de probióticos durante o período pós-natal inicial é proposto como uma possível estratégia para modular intencionalmente a composição da microbiota e reduzir o risco de doença, o que pode ocorrer pelo fornecimento de bactérias durante a lactação (SANZ, 2011).

2.8 Sistema imunológico da mucosa intestinal

A defesa da mucosa intestinal é formada por três componentes distintos: a barreira epitelial intestinal, a lâmina própria e o tecido linfóide associado ao intestino. O GALT, por sua vez, é composto por três estruturas diferentes de tecidos linfóides organizados, incluindo as placas de Peyer, os folículos linfóides isolados (ILFs) e os linfonodos mesentéricos (MLNs) que, juntos, formam o maior órgão linfático do corpo humano (AHLUWALIA; MAGNUSSON; ÖHMAN, 2017).

O epitélio intestinal é a maior superfície mucosa do corpo humano e estabelece uma interação entre o ambiente externo e o hospedeiro, regida pela permeabilidade e a defesa da mucosa intestinal (FASANO; SHEA-DONOHUE, 2005). O hospedeiro evoluiu com adaptações imunes e fisiológicas para manter uma vigilância constante contra antígenos luminiais potencialmente nocivos, evitando o desenvolvimento de inflamações descontroladas. Nesse sentido, a barreira intestinal fornece a primeira linha de defesa, separando fisicamente o meio interno do lúmen intestinal, e através de mecanismos ativos como reconhecimento microbiano, produção de peptídeos antimicrobianos, muco e secreção de anticorpos (NATIVIDAD; VERDU, 2013).

Junto com a camada mucosa, as células epiteliais intestinais (IECs) formam uma barreira física do sistema imunológico da mucosa intestinal e participam diretamente da vigilância imunológica do intestino (SHI et al., 2017). Junções apicais (aderentes e proteínas de junções de oclusão) se ligam as células epiteliais e regulam o antígeno paracelular e a entrada de moléculas através do epitélio (NATIVIDAD; VERDU, 2013). As células especializadas do epitélio, como as células caliciformes e as células de Paneth, secretam mucinas e peptídeos antimicrobianos (PAMs), respectivamente, auxiliando no estabelecimento da função de barreira (PETERSON; ARTIS, 2014). Outras células epiteliais especializadas, chamadas células M mediam a amostragem constante de antígenos luminal, pois uma ampla gama de microorganismos e macromoléculas podem entrar através dessas células (NATIVIDAD; VERDU, 2013; PETERSON; ARTIS, 2014). O epitélio intestinal contém também inúmeros linfócitos conhecidos como linfócitos intraepiteliais (IELs) que estão em contato direto com as IECs e têm contato imediato com antígenos intestinais, formando a linha de frente da defesa imune contra os patógenos invasores (AHLUWALIA; MAGNUSSON; ÖHMAN, 2017). Quando os IELs são ativados, expressam citocinas, como IFN- γ e fator de crescimento de queratinócitos (KGF), para proteger as células epiteliais contra lesões (SHI et al., 2017). Além disso, as células epiteliais intestinais expressam vários receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como os receptores tipo Toll (TLR) e NOD (NLRs) que podem reconhecer padrões moleculares

microbianos específicos (PAMPs). A sinalização através desses receptores promove resposta imune inata tecido-específicas, incluindo a produção de citocinas (NATIVIDAD; VERDU, 2013; SHI et al., 2017).

A Lâmina própria reside na camada inferior das células epiteliais intestinais, e é um importante local efetor da resposta imune intestinal, previne a entrada e propagação de agentes patogênicos através da mucosa intestinal e elimina patógenos em caso de invasão. É composta de linfócitos T ($CD4^+$, $CD8^+$, Tregs) e B produtoras de IgA, além de células dendríticas, macrófagos, mastócitos, eosinófilos e células linfóides inatas (ILCs) (AHLUWALIA; MAGNUSSON; ÖHMAN, 2017; PETERSON; ARTIS, 2014; SHI et al., 2017).

As placas de Peyer (PP) são considerados locais indutivos primários para a resposta imune da mucosa. Apresentam linfócitos B e T ($TCD4^+$, $TCD8^+$), DCs e macrófagos, e são locais de maturação das células B produtoras de IgA. Os folículos linfóides isolados por sua vez, são semelhantes as PPs, porém, menores e distribuídos ao longo do intestino, diferente das PPs que são encontradas no íleo distal. Já os linfonodos mesentéricos, filtram a linfa e induzem respostas imunes contra antígenos. Além de um grande número de linfócitos, os linfonodos mesentéricos contêm macrófagos e células apresentadoras de antígenos (APCs), e é um local eficiente onde APCs podem interagir com linfócitos naive podem sofrer uma maior diferenciação (AHLUWALIA; MAGNUSSON; ÖHMAN, 2017; SHI et al., 2017)

O TGI é um ambiente peculiar devido ao seu contato constante com a microbiota, antígenos alimentares e outras moléculas. Essa exposição requer o estabelecimento de mecanismos regulatórios importantes para evitar a resposta inflamatória e autoagressão. Nesse sentido, o GALT desempenha um papel importante, pois modula a tolerância versus antígenos luminiais através de processos que envolvem citocinas específicas e populações celulares, processo conhecido como tolerância oral (PERON; DE OLIVEIRA; RIZZO, 2009). A tolerância oral é capaz de evitar a resposta inflamatória contra proteínas alimentares e autoagressão contra a própria microbiota bacteriana intestinal residente do hospedeiro através do estabelecimento de um mecanismo tolerante. As células T $CD4^+$ naive suprimem a expressão de células T efectoras (Th1 e Th2) e estimula a expansão das células Tregs por secreção de citocinas tais como IL-10 e TGF- β (DI MAURO et al., 2013). O antígeno é apresentado a células T $CD4^+$ naive no linfonodo mesentérico ou placas de Peyer. Essas células então se diferenciam em células T reguladoras, que produzem células IL-10 e IFN- γ e/ou T helper 3, que produzem TGF- β . As consequências imunológicas são a produção local de IgA, a tolerância sistêmica e homeostase imunológica local (MOWAT, 2003).

2.9 Atividade antinociceptiva

A dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ao dano tecidual real ou potencial. É uma sensação subjetiva e cada indivíduo aprende a utilizar esse termo através das suas experiências anteriores (RIEDEL; NEECK, 2001). Portanto, é uma experiência complexa que envolve não apenas a transdução de estímulos ambientais nocivos, mas também alterações cognitivas e emocionais processadas pelo cérebro (JULIUS; BASBAUM, 2001).

A capacidade de detectar estímulos nocivos é essencial para a sobrevivência e o bem-estar de um organismo, contudo, alterações na via da dor levam à hipersensibilidade, e a dor perde a sua utilidade como um sistema de alerta agudo e torna-se crônica e debilitante (BASBAUM et al., 2009). A dor aguda é uma característica cardinal da inflamação. A maioria dos mediadores inflamatórios conhecidos causam dor ao se ligar aos receptores nos neurônios nociceptivos sensitivos primários no sistema nervoso periférico (nociceptores) que inervam pele, músculo, articulações e vísceras (GOLD; GEBHART, 2010; JI; CHAMESSIAN; ZHANG, 2016). A nocicepção refere-se a um fenômeno sensorial fisiológico. Estímulos nociceptivos causam danos nos tecidos, ativando receptores sensoriais periféricos, os nociceptores (COUTAUX et al., 2005). Os nociceptores estão localizados nas terminações de fibras nervosas A δ e C e, quando ativados, sofrem alterações na sua membrana, permitindo a deflagração de potenciais de ação (ROCHA et al., 2007). Presume-se que essas fibras, respectivamente, estejam relacionadas com a dor primária, ou seja a dor rápida e aguda, e com a dor secundária, uma dor tardia e difusa. A dor visceral, por sua vez, é única, pois não há os componentes primário e secundário, ao contrário, a dor visceral frequentemente é mal localizada, profunda e lenta.(JULIUS; BASBAUM, 2001).

As fibras aferentes A δ e C são classificadas de acordo com o grau de mielinização e a velocidade de condução. As fibras A δ são mielinizadas (diâmetro, 1-5 μ m), apresentam velocidade de condução de aproximadamente 5-30 m/s, e respondem a estímulos mecânicos e térmicos. As fibras C são amielinizadas (diâmetro, 0,3-1,5 μ m), apresentam condução lenta de 0,4-1,4 m/s e são polimodais, respondem a estímulos químicos, mecânicos e térmicos (COUTAUX et al., 2005; DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010).

Os nociceptores traduzem um estímulo agressivo de natureza térmica, química ou mecânica, em estímulo elétrico que será transmitido até o sistema nervoso central e interpretado no córtex cerebral como dor (ROCHA et al., 2007). Os neuromediadores periféricos levam a

despolarização da membrana neural por tempo prolongado, aumentando a condutância do sódio (Na^+) e cálcio (Ca^{++}) e reduzindo o influxo de potássio (K^+) e cloro (Cl^-) para o meio intracelular. Os canais de sódio estão envolvidos na origem da hiperexcitabilidade neuronal (ROCHA et al., 2007).

Os mediadores inflamatórios são liberados localmente após lesões nos tecidos, como por exemplo, bradicinina, prostaglandinas, H^+ , ATP, fator de crescimento nervoso (NGF), citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, e podem estimular diretamente e causar sensibilização de nociceptores de detecção de dor localizados em fibras nervosas de neurônios aferentes primários em tecidos periféricos (JI; XU; GAO, 2014).

Os potenciais de ação que transmitem a dor somática são conduzidos ao sistema nervoso central (SNC) através de uma cadeia de três neurônios. Os neurônios de primeira ordem com seus corpos celulares no gânglio da raiz dorsal fazem sinapse com neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004; RIEDEL; NEECK, 2001) que é organizado em lâminas. Os nociceptores A δ projetam-se para a lâmina I e V, e os nociceptores C mais superficialmente para as lâminas I e II (BASBAUM et al., 2009). Os aferentes nociceptivos que terminam no corno dorsal liberam glutamato, aspartato, substância P (SP) e peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP) como principais transmissores nociceptivos (RIEDEL; NEECK, 2001). Os neurônios de segunda ordem transmitem os impulsos nociceptivos para estruturas do tronco cerebral e diencéfalo, incluindo o tálamo, substância cinzenta periaquedutal, região parabraquial, formação reticular da medula, complexo amigdalóide, núcleo septal e hipotálamo, entre outras (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004), e fazem sinapse com neurônios de terceira ordem, que projetam através da cápsula interna e corona radiata para o giro pós-central do córtex cerebral, onde a informação é somatotopicamente organizada (CROSS, 1994).

A restauração da homeostase e a indução de analgesia também é função importante do sistema nociceptivo. Após o recebimento no corno dorsal da medula espinhal, a informação nociceptiva sofre um processamento extensivo que pode aprimorar ou mesmo inibir sua transferência para centros superiores. Nesse sentido, vias descendentes que se projetam das estruturas cerebrais para o corno dorsal desempenham um papel complexo e crucial. Essa modulação da dor é um processo fisiológico comportamental significativo, e envolve a liberação de peptídeos opióides, GABA, aminas biogênicas e outros transmissores (MILLAN, 2002; RIEDEL; NEECK, 2001; STAMFORD, 1995).

2.9.1 Atividade antinociceptiva de probióticos

Sabe-se que a microbiota intestinal pode modular a função cerebral através do eixo intestino-cérebro, sistema bidirecional de comunicação neuro-humoral que envolve principalmente a regulação da fisiologia gastrointestinal, atividade da microbiota pelo cérebro, e a própria modulação da função cerebral pela microbiota intestinal – eixo intestino cérebro (DAI et al., 2017). O cérebro pode influenciar a microbiota entérica indiretamente através de alterações na motilidade gastrointestinal, secreção e permeabilidade intestinal, ou diretamente, através de moléculas de sinalização liberadas no interior do lúmen intestinal das células na lâmina própria (células enterocromafins, neurônios, células imunes). A microbiota entérica por sua vez, atua no desenvolvimento e sustento das funções intestinais sensoriais e motoras, através da comunicação com o cérebro que ocorre indiretamente através da interação com células epiteliais e sinalização mediada por receptor, e diretamente através da estimulação de células neuronais na lâmina própria, quando a permeabilidade intestinal é aumentada (DI MAURO et al., 2013).

A administração oral de *L. acidophilus* NCFM mostrou que o contato dessa cepa com células epiteliais foi capaz de induzir, através da via NF-kB, a expressão de receptores μ -opioides e canabinóides e exercer funções analgésicas semelhantes aos efeitos da morfina (ROUSSEAU et al., 2007).

A microbiota intestinal é capaz de produzir neurotransmissores que podem se ligar aos receptores do hospedeiro (intra e extra intestinal) em quantidades suficientes para efetuar mudanças neurofisiológicas, portanto, influenciar o eixo intestino-cérebro (FOSTER et al., 2016). Barrett et al. (2012) demonstraram que cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* foram capazes de produzir o neurotransmissor GABA. E a ingestão de *L. rhamnosus* (JB-1) regulou o comportamento emocional e a expressão central do receptor GABA em modelo animal através do nervo vago (BRAVO et al., 2011). DAVIS et al. (2016) também demonstraram que o tratamento com *L. plantarum* reduziu o comportamento relacionado à ansiedade e alterou a sinalização GABAérgica, e especialmente a sinalização serotoninérgica no cérebro.

Reigstad et al. (2015) demonstraram que micro-organismos intestinais atuam através dos ácidos graxos de cadeia curta nas células enterocromafins promovendo a produção de serotonina, neurotransmissor relacionado, entre outras funções, com a diminuição da sensibilidade a dor (BENSON et al., 2015). As células enterocromafins são transdutores bidirecionais importantes que regulam a comunicação entre o intestino e o sistema nervoso. A

inervação vagal e aferente dessas células fornece uma via direta para circuitos neuronais, que podem ter um papel importante na dor e na modulação da resposta imune, controle de emoções e outras funções homeostáticas (RHEE; POTHOUKAKIS; MAYER, 2009).

Componentes da parede celular ou produtos secretados, incluindo neurotransmissores, de micro-organismos no lúmen ou ligados às células epiteliais podem induzir essas células a liberar moléculas transmissoras que, por sua vez, modulam a sinalização neural ou age diretamente nos axônios aferentes primários (FORSYTHE; KUNZE, 2013). Ingestão oral de *L. plantarum*, com teor de D-alanina do ácido lipoteicoico reduzido (mutante) inibiu a percepção da dor visceral em ratos (DUNCKER et al., 2008). Kamiya et al. (2006) também demonstraram que a ingestão oral de *L. reuteri* inibiu a percepção da dor visceral induzida pela distensão colorretal, resultado acompanhado pela diminuição da atividade aferente do gânglio da raiz dorsal, demonstrando efeitos antinociceptivos de *L. plantarum*.

2.10 Atividade anti-inflamatória

O sistema imunológico é fundamental para a saúde humana e o bem-estar, pois ajuda a coordenar a resposta do corpo a feridas físicas e infecções que, se não forem resolvidas, podem causar doenças ou até mesmo a morte (SLAVICH; IRWIN, 2014). Os mecanismos de defesa do hospedeiro são constituídos pela imunidade inata, e pela imunidade adquirida ou adaptativa (ABBAS; LICHTMAN, 2013). A imunidade inata, é a primeira linha de defesa do corpo contra danos nos tecidos e infecção microbiana. É composta por células imunes, como monócitos/macrófagos e células dendríticas que circulam constantemente no corpo e usam receptores para detectar uma grande variedade de agentes patogênicos. Essas células sinalizam a ocorrência de lesão ou infecção e iniciam uma cascata de processos inflamatórios que ajudam a conter a infecção e promover a cicatrização e recuperação do tecido (SLAVICH; IRWIN, 2014). Quando as defesas inatas são insuficientes, essas células ativam a resposta imune adaptativa, que consiste na expansão de linfócitos patógenos-específicos, um processo que é altamente efetivo e específico, mas que leva dias para se desenvolver completamente (BARTON, 2008).

A primeira resposta do sistema imunológico à invasão por agentes patogênicos é uma reação inflamatória inespecífica que pode ocorrer tanto localmente, quanto sistematicamente (HENNESSY; SCHIML-WEBB; DEAK, 2009). Clinicamente, a inflamação é caracterizada por cinco sinais cardinais: rubor, calor, tumor, dor e perda de função. A inflamação aguda é

uma resposta protetora, que envolve células imunes, vasos sanguíneos e mediadores inflamatórios, cuja função é eliminar a causa inicial de lesão celular e iniciar o reparo tecidual.(JI; CHAMESSIAN; ZHANG, 2016). No local da infecção ou lesão tecidual, uma série de respostas do próprio tecido são iniciadas. As citocinas pró-inflamatórias são liberadas e o sistema vascular e as células inflamatórias são ativados. Essas respostas, por sua vez, estão associadas à produção de mais citocinas e outros mediadores inflamatórios que se difundem para o compartimento do líquido extracelular e circulam no sangue (GRUYS et al., 2005).

A resposta inflamatória típica consiste em quatro componentes: indutores inflamatórios, sensores que os detectam, mediadores inflamatórios induzidos pelos sensores e os tecidos alvo afetados pelos mediadores inflamatórios (MEDZHITOV, 2010). O reconhecimento de agentes patogênicos é mediado por receptores de reconhecimento padrão, como por exemplo, os TLRs. Esses receptores reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos, que são compartilhados por grandes grupos de micro-organismos (AKIRA; TAKEDA; KAISHO, 2001). Os PAMPs bacterianos são frequentemente componentes da parede celular, como os lipopolissacarídeos, peptidoglicanos, ácidos lipoteicoicos e lipoproteínas de parede celular (MEDZHITOV, 2007). Os TLRs são expressos por células fagocíticas, como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (BARTON, 2008), e quando ativados, inicia uma cascata de sinalização conservada que resulta na ativação dos fatores de transcrição intracelulares, NF-kB e fator regulador do interferon (IRF), que conduzem a expressão de genes da resposta imune pró-inflamatória (SLAVICH; IRWIN, 2014). Os TLRs ativam os macrófagos residentes no tecido para produzir citocinas pró-inflamatórias, como o TNF, interleucina-1 β e IL-6, quimiocinas (por exemplo, CCL2 e CXCL8), e prostaglandinas, que coordenam respostas inflamatórias locais e sistêmicas. Esses mediadores inflamatórios agem nos tecidos alvo, incluindo vasos sanguíneos locais, para induzir vasodilatação, extravasamento de neutrófilos e vazamento de plasma no tecido lesionado. A função dos neutrófilos recrutados na circulação, os macrófagos residentes nos tecidos e os mastócitos (envolvidos nas fases iniciais da inflamação através da liberação de citocinas, histamina, prostaglandinas e leucotrienos) é eliminar os patógenos invasores. TNF e IL-1 β e IL-6 favorecem um aumento na quantidade de fator tecidual (também conhecido como fator de coagulação III) no endotélio que leva a uma cascata de coagulação local que ajuda a prevenir a disseminação microbiana através do sangue; ativam o endotélio cerebral para produzir prostaglandinas, incluindo a principal prostaglandina pro-inflamatória, PGE2 e ativam hepatócitos para produzir proteínas de fase aguda, que por sua

vez, ativam o complemento e opsonizam patógenos para a fagocitose por macrófagos e neutrófilos (MEDZHITOV, 2007, 2010).

Os neutrófilos entram no local inflamado e liberam o conteúdo de seus grânulos, que incluem proteases, espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) para eliminar os agentes invasores. Se os neutrófilos detectam TNF- α , mas não encontram diretamente partículas microbianas após entrar nos tecidos, eles liberam seus grânulos no espaço extracelular na tentativa de criar um ambiente inóspito para patógenos nas proximidades (BARTON, 2008). Ao iniciar um evento inflamatório (por lesão ou por infecção microbiana), a rápida destruição dos leucócitos implantados exige que o tecido volte à homeostase (SERHAN, 2007). Nesse contexto, inicia-se uma fase de resolução e reparo, mediada principalmente por macrófagos residentes e recrutados pelos tecidos. A troca de mediadores lipídicos de prostaglandinas pró-inflamatórias para lipoxinas, que são anti-inflamatórias, é crucial para a transição da inflamação para a resolução. As lipoxinas inibem o recrutamento de neutrófilos e, em vez disso, promovem o recrutamento de monócitos, que removem células mortas e iniciam a remodelação tecidual (MEDZHITOV, 2008). Além desses mediadores de resolução, macrófagos, neutrófilos e células epiteliais produzem inibidor secretor de protease de leucócitos (SLPI), que inativa as proteases liberadas a partir de grânulos de neutrófilos (BARTON, 2008). Se a resposta inflamatória aguda não consegue eliminar o patógeno, o processo inflamatório persiste e o infiltrado de neutrófilos é substituído por macrófagos e células T (MEDZHITOV, 2008). No caso de uma resposta não favorável aos invasores e/ou a destruição da estrutura do tecido, a cicatrização pode ocorrer e/ou o tecido irá progredir para um estado inflamatório crônico e até fibrose (SERHAN, 2007).

2.10.1 Atividade anti-inflamatória de probióticos

Evidências de sistemas *in vitro* e em modelos animais e humanos sugerem que os probióticos podem estimular tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa. Acredita-se que esses efeitos sejam mediados por ativação de macrófagos, aumento nos níveis de citocinas anti-inflamatórias (IL-10), diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IFN- γ), aumento da atividade das células NK (“natural killer”), e secreção de IgA (COPPOLA; TURNES, 2004; SAAD, 2006; SEIDMAN; BERNOTTI; LEVY, 2002).

A interação direta entre probióticos e células imunes é mediada via sinalização de TLRs. A ativação desses receptores leva a respostas que podem desencadear uma maturação

balanceada das células-T (Th1 e Th2) e células-T regulatórias, permitindo uma reação adequada a possíveis patógenos e antígenos alimentares (BINNS, 2014; GREDEL, 2012). Yao et al. (2017) investigando o efeito regulador dos probióticos na expressão de receptores Toll-like em um modelo de rato de colite ulcerosa, doença caracterizada por uma resposta imune anormal no intestino, demonstrou que probióticos podem regular o equilíbrio da microbiota intestinal e inibir a resposta imune mediada por TLRs, reduzindo assim, a patogênese da reação inflamatória intestinal. Entretanto, Galdeano et al. (2015), com o objetivo de estudar a participação de TLRs em macrófagos quando estimulados por diferentes bactérias probióticas ou leite fermentado probiótico, demonstrou que TLRs estão envolvidos no processo fagocítico de macrófagos peritoneais e do baço, e são uma via utilizada por micro-organismos probióticos para ativar estas células. Porém, macrófagos da placa de Peyer apresentaram baixa atividade fagocitária, quando os probióticos foram administrados. Os pesquisadores ainda demonstraram, que a administração probiótica induziu níveis elevados de IL-10 em macrófagos peritoneais e o TLR2 mostrou ser a principal via para a produção dessa citocina. Contudo, no baço, os níveis atingidos pela IL-10 foram inferiores aos obtidos com macrófagos peritoneais, e nas PP a produção foi mais regulada, sendo que administração probiótica não induziu níveis elevados desta citocina. Esses resultados levaram a conclusão de que a ativação de macrófagos depende da localização dos mesmos, e que diferentes cepas probióticas podem desencadear diferentes intensidades de respostas, sugerindo que os probióticos não apenas promovem uma expressão importante de TLRs, mas também utilizam estes receptores através das células imunes inatas como macrófagos para estimular e modular a resposta imune.

Tsai et al. (2010) demonstrou que *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 induziu uma interação mais forte de células dendríticas e células TCD4⁺, aumento de células TCD4⁺ e proliferação de células B, aumento de IL-1 β , IL-10, IL-12, IFN- γ e expressão de mRNA TNF- α nas placas de Peyer, promovendo assim, maior produção de IgA intestinal que poderia aumentar a vigilância imunológica para prevenir infecções intestinais ou outras patologias intestinais. Vinderola et al. (2007) investigando a capacidade imunomoduladora *in vivo* do exopolissacarídeo produzido por *Lactobacillus kefiranofaciens*, observou que o exopolissacarídeo também é capaz de induzir uma resposta na mucosa intestinal, regulando a imunidade para ter uma característica mais protetora, mantendo a homeostase intestinal, aumentando a produção de IgA no intestino e influenciando a imunidade sistêmica através das citocinas (IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ) liberadas para a circulação sanguínea.

3. JUSTIFICATIVA

A microbiota do TGI exerce atividades metabólicas, nutricionais, fisiológicas e imunológicas no corpo humano, desempenhando um papel importante na saúde humana. Variações na composição da microbiota têm sido reconhecidas em várias doenças (GERRITSEN et al., 2011; MILANI et al., 2016), levando a um crescente desenvolvimento de pesquisas utilizando a microbiota intestinal como um potencial fator modificável para o desenvolvimento de doenças. Uma abordagem comum para transmitir benefícios para a saúde através da modificação da microbiota intestinal tem sido a utilização de probióticos (KRISTENSEN et al., 2016).

As principais vias de colonização inicial do TGI após o nascimento são a microbiota materna, especialmente durante o parto vaginal, e a dieta da criança, leite materno ou fórmula (WALL et al., 2009). As bactérias também podem ser transmitidas via intra-uterina, pois já foram detectadas bactérias em corioamnio e líquido amniótico de mulheres grávidas e no sangue do cordão umbilical obtido de recém nascidos saudáveis (AAGAARD et al., 2014; BEARFIELD et al., 2002; JIMENEZ et al., 2005, 2008a). No entanto, a maioria dos estudos apoiam que a transferência de lactobacilos da mãe para os filhos ocorre do trato gastrointestinal materno para o leite humano (ABRAHAMSSON et al., 2009; ARROYO et al., 2010; JIMÉNEZ et al., 2008), e do leite para o trato gastrointestinal neonatal, por meio de uma via enteromamária (JIMENEZ et al., 2008b; MARTIN et al., 2012). A microbiota mamária começa a desenvolver-se durante o último terço da gravidez, atinge a maior complexidade no final desse período, permanece bem constante ao longo da lactação, diminui acentuadamente ao desmame e desaparece na involução mamária (FERNÁNDEZ et al., 2012).

Durante a primeira infância, a dieta tem um papel fundamental no desenvolvimento da microbiota intestinal (VANDENPLAS et al., 2011). Na idade adulta, a dieta também exerce uma grande influência na composição e função da microbiota (LANE; ZISMAN; SUSKIND, 2017). Mudanças induzidas pela dieta nas comunidades microbianas intestinais são agora suspeitas de contribuir para epidemias crescentes de doenças crônicas no mundo desenvolvido (DAVID et al., 2014). A microbiota gastrointestinal materna, a microbiota vaginal e a composição do leite materno são influenciadas pela dieta materna. Alterações da composição da microbiota gastrointestinal materna através de suplementação com probióticos e prebióticos foram demonstradas. No entanto, a transferência desses benefícios para a prole continua a ser estudada (THUM et al., 2012). Esta interação entre mãe e filho durante a gravidez e após o

nascimento e a introdução da nutrição (amamentação e introdução de alimentos sólidos) influenciam o desenvolvimento do sistema imunológico da criança.

Vários trabalhos mostraram que a suplementação com probióticos para mulheres durante a gravidez e a lactação pode modular não só a composição microbiana do leite, mas também o nível de imunidade do leite materno, sendo os benefícios imunológicos transferidos para os bebês (BALDASSARRE et al., 2016). Bactérias ácido lácticas isoladas a partir de leite humano são capazes de modular as respostas imunes naturais e adquiridas em camundongos e seres humanos (DIAZ-ROPERO et al., 2007; OLIVARES et al., 2007). Assim, a administração de probióticos durante a fase final da gestação e durante a lactação pode alterar a composição do leite materno, formado por uma grande variedade de componentes nutricionais e microbiológicos que afetam o desenvolvimento e a função do sistema imunológico do bebê, podendo modular positivamente a sua imunidade, trazendo mais benefícios à sua saúde.

A maioria dos estudos aborda os efeitos de cepas probióticas específicas ou prebióticos em lactentes em sintomas alérgicos e a incidência e gravidade das infecções. Os efeitos a longo prazo da alteração da microbiota no sistema imune da prole ainda são poucos estudados (VOS et al., 2007). Portanto, permanece a questão se os compostos imunomoduladores do leite materno humano podem ter efeitos semelhantes nos primeiros meses de vida e a longo prazo na vida adulta (RABET et al., 2008). A exposição nutricional e metabólica durante períodos críticos de desenvolvimento humano precoce pode ter um efeito de programação a longo prazo sobre a saúde na idade adulta. Isto é apoiado por evidências de estudos epidemiológicos, numerosos modelos de animais e ensaios clínicos de intervenção (DEMMELMAIR; VON ROSEN; KOLETZKO, 2006).

Existem muitos estudos que investigam um possível papel da amamentação no risco de desenvolver muitas doenças comuns em que a inflamação desempenha um papel central na patogênese (PALMEIRA; CARNEIRO-SAMPAIO, 2016). Entretanto, efeito protetor a longo prazo também pode ser observado em estudos epidemiológicos que sugerem que o leite humano reduz o risco de desenvolvimento de doenças autoimunes, como diabetes mellitus tipo 1 e 2, artrite reumatoide, doença celíaca, colite ulcerativa e doença de Crohn (HANSON, 2007). Outros estudos indicam que a amamentação tem um efeito protetor contra doenças vasculares crônicas, incluindo hipertensão, obesidade e/ou resistência à insulina (MARTIN et al., 2005; MARTIN; GUNNELL; SMITH, 2005; SINGHAL et al., 2004; SINGHAL; LUCAS, 2004). Uma meta-análise mostrou que a amamentação protege contra tumores infantis como leucemia linfoblástica aguda, doença de Hodgkin e neuroblastoma (MARTIN et al., 2005).

Os efeitos benéficos dos probióticos estão diretamente e exclusivamente relacionados ao tipo de cepa utilizada (AGOSTONI et al., 2004). Nas últimas décadas, tem havido um número crescente de estudos que visa decifrar os potenciais efeitos benéficos do tratamento com cepas de *L. plantarum* na saúde humana (SIEZEN; VAN HYLCKAMA VLIEG, 2011), incluindo atividades anti-inflamatória (PATHMAKANTHAN et al., 2004) e antinociceptiva (NOBAEK et al., 2000). Dos Santos et al. (2016) investigou o efeito do agrupamento de *L. fermentum* e *L. plantarum*, incluindo *L. plantarum* Lp62, obtidas a partir da fermentação do cacau em um modelo de colite experimental, e observou uma redução do número total de leucócitos sanguíneos, principalmente neutrófilos e monócito, redução da produção de IFN- γ , e aumento na concentração de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, que age modulando a resposta inflamatória e restaurando a tolerância aos antígenos luminais (LAMMERS et al., 2003). Messias (2017) demonstrou que a administração diária oral de *L. plantarum* Lp62 em ratas Wistar, sete dias antes do parto e durante 20 dias de lactação, aumentou o teor nutricional do leite (proteínas, triglicerídeos e colesterol), enquanto diminui o teor de TNF- α do leite materno.

Diante do potencial probiótico demonstrado por *L. plantarum* Lp62 nos estudos previamente realizados com modelos experimentais *in vivo*, justifica-se o desenvolvimento deste estudo que visa avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva da administração oral de *Lactobacillus plantarum* Lp62, isolado da fermentação de amêndoas de cacau, em modelo experimental animal.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva da administração oral de *Lactobacillus plantarum* Lp62, isolado da fermentação de amêndoas de cacau, em modelo experimental animal.

4.2 Objetivos específicos

Avaliar o potencial probiótico da administração oral de *L. plantarum* Lp62 em camundongos *Balb/C* machos adultos tratados por sete dias quanto à atividade anti-inflamatória e antinociceptiva;

Avaliar o potencial probiótico da administração oral de *L. plantarum* Lp62 em camundongos *Balb/C* fêmeas tratadas durante a gestação e lactação, quanto à atividade anti-inflamatória e antinociceptiva;

Avaliar o potencial probiótico da suplementação por via oral de *L. plantarum* Lp62 em fêmeas tratadas durante a gestação e lactação, quanto a sua influência nas atividades anti-inflamatória e antinociceptiva nos filhotes camundongos *Balb/C* machos não tratados;

Determinar a concentração de citocinas (IL-10, TNF- α e IL-1 β) no lavado peritoneal de camundongos *Balb/C* machos adultos tratados por sete dias por via oral de *L. plantarum* Lp62;

Determinar a variação do peso corporal dos filhotes camundongos *Balb/C* não tratados e das mães tratadas durante a gestação e lactação com suplementação oral com *L. plantarum* Lp62;

Avaliar possível toxicologia da administração oral de *L. plantarum* Lp62 nos camundongos ao final dos experimentos.

5. METODOLOGIA

5.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos *Balb/C* (20-30 g). Os animais foram mantidos no biotério do Instituto Multidisciplinar em Saúde no ciclo claro-escuro 12 horas (luzes acessas das 6 às 18 horas), a temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $50 \pm 2\%$, individualmente em caixas de polipropileno contendo maravalha na base da caixa e acesso livre à comida e água.

Inicialmente, antes do cruzamento, foi realizada a determinação do ciclo estral através do lavado vaginal de todos os camundongos fêmeas. O fluido vaginal foi coletado com uma pipeta de plástico contendo uma gota de solução salina (NaCl a 0,9%) que foi injetada, aspirada e colocada na lâmina para visualização ao microscópio, nas objetivas de 10 e 40x. As fêmeas foram colocadas para cruzar após ser identificada a presença predominante de células arredondadas, polinucleadas, dispersas ou agrupadas, indicando a fase de proestro ou com o esfregaço vaginal constituído predominantemente de células cornificadas, dando o aspecto de “folhas secas”, fase estral. Os experimentos foram iniciados por volta do 14º dia de gestação.

O estudo foi autorizado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais em Pesquisa (CEUA) da Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira (protocolo nº 035/2015).

5.2 Micro-organismo Probiótico

O micro-organismo estudado foi a cepa *L. plantarum* Lp62 (identificado por sequenciamento do gene 16S rRNA / GenBank: KU291427) (SANTOS et al., 2016) proveniente da Coleção de Bactérias Lácticas do Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) (Carla Romano), obtida da fermentação espontânea de amêndoas do cacau da região de Ilhéus-Itabuna/BA (DOS SANTOS et al., 2016).

A bactéria foi reativada por crescimento em meio MRS caldo, à 37°C , 5% de CO_2 por 24h e plaqueada em meio MRS ágar e realizada a coloração de Gram para verificação da pureza do repique. Também foi realizada uma curva de crescimento em sistema fechado com incubação em meio MRS líquido, nas mesmas condições de temperatura e CO_2 . A curva de crescimento microbiano foi determinada por espectrofotometria (absorbância: 630 nm) e a

contagem de células viáveis foram determinadas por diluições seriadas e semeadura em meio MRS ágar a cada hora.

O crescimento máximo apresentou 10^9 UFC/mL da cepa em estudo (VERNA; LUCAK, 2010), e foi obtido após 12 horas de crescimento. Diariamente as bactérias foram inoculadas em meio MRS caldo, à 37°C, 5% de CO₂ por 12 horas, e administrado por gavagem (via oral) 0,2 ml da suspensão bacteriana ($1,44 \times 10^9$ UFC/0,2/mL - $7,2 \times 10^9$ UFC/mL) por animal no grupo tratamento. No grupo controle, foi administrado por via oral 0,2 mL de salina a 0,9%.

5.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de *L. plantarum* Lp6 em modelo experimental animal

Para avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do *L. plantarum* Lp62 foram realizados, separadamente, o teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, o teste de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina, e o de recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Para todos os testes anti-inflamatórios e antinociceptivos foram utilizados três grupos experimentais de camundongos *Balb/C*. O primeiro grupo de estudo foi constituído por camundongos machos adultos (3 meses) (total n=12, controle e tratamento) tratados por gavagem oral por um período de sete dias (Figura 1).

O segundo grupo foi formado por camundongos fêmeas tratadas durante a gestação e lactação (total n=12, controle e tratamento) (Figura 1). As fêmeas iniciaram o tratamento por gavagem uma semana antes da data prevista do parto, continuando ao longo do período de aleitamento até ao dia do desmame (21º dia). Dentro das primeiras 24hs da ocorrência do parto, as ninhadas foram remanejadas, de modo que cada mãe ficou com o mesmo número de filhotes machos (n=4). Os camundongos machos provenientes da ninhada das fêmeas tratadas durante a gestação e lactação constituíram o terceiro grupo de estudo (total n=48, controle e tratamento), e não receberam tratamento por gavagem (Figura 1). Para cada um dos testes realizados, diariamente, o grupo controle recebeu 0,2 ml de solução salina 0,9%, e o grupo tratamento recebeu 0,2 ml de suspensão bacteriana por gavagem oral do micro-organismo probiótico ($1,44 \times 10^9$ UFC/0,2mL - $7,2 \times 10^9$ UFC/mL) (Figura 1). Os camundongos *Balb/C* machos tratados por sete dias, e os camundongos *Balb/C* fêmeas tratadas durante a gestação e lactação, foram para a avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva no oitavo dia, e um dia após o último dia de lactação - 21º dia, respectivamente. Os camundongos *Balb/C* machos

provenientes das fêmeas tratadas durante a gestação e lactação foram testados três meses após o seu nascimento, na fase adulta, sendo o grupo controle proveniente das fêmeas tratadas com solução salina 0,9%, e o grupo tratamento proveniente das fêmeas tratadas com suspensão bacteriana do micro-organismo probiótico (Figura 1).

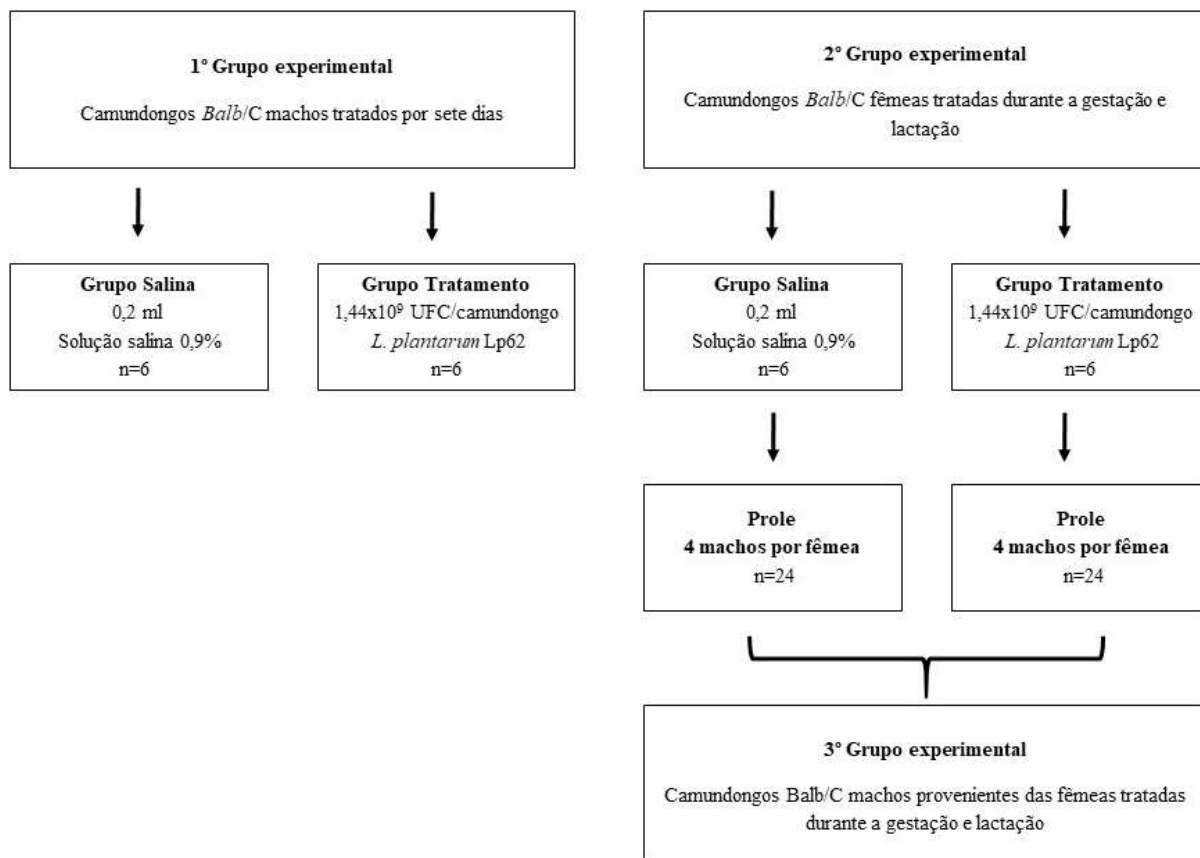


Figura 1. Grupos experimentais.

5.3.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

O efeito antinociceptivo de *L. plantarum* Lp62 foi avaliado pelo teste de contorção abdominal induzida por ácido acético 0,6% (Sigma-Aldrich®), de acordo com procedimentos previamente descritos por Koster; Anderson; Boer (1959) e Vacher; Marullaz; Barbot (1964). Os três grupos experimentais tratamento e controle, receberam injeção de ácido acético (10 mL/kg, intraperitoneal), e as contorções da parede abdominal, seguidas de contorções do tronco e extensão dos membros posteriores produzidas foram contadas durante 20 minutos como indicativo de nocicepção.

5.3.4 Nociceção induzida pela injeção intraplantar de formalina

A atividade antinociceptiva de *L. plantarum* Lp62 também foi avaliada através do ensaio de nociceção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Os três grupos experimentais de camundongos *Balb/C*, tratamento e controle, receberam injeção de solução de formalina na concentração de 1% (formaldeído) por via intraplantar (20 µL/pata) na pata posterior direita. Durante 30 minutos foram quantificados os números de *flinches*, sacudir da pata, mordidas e lambidas como indicadores de nociceção. Os primeiros cinco minutos determinou resposta à dor de origem neurogênica, e dos 15 à 30 minutos, resposta à dor de origem inflamatória (TJØLSEN et al., 1992). Neste teste, também foi medido o edema formado na pata direita, sendo calculada a diferença entre o volume deslocado da pata direita e o da pata esquerda através da pesagem das duas patas. Como controle positivo (padrão ouro) dos analgésicos, foi adicionado ao experimento um grupo de camundongos *Balb/C* machos adultos (n=8) tratados separadamente por via subcutânea (s.c.) com morfina (5 mg/kg respeitando 10 ml/kg). Como controle positivo dos anti-inflamatórios, um grupo de camundongos *Balb/C* machos adultos (n=8) foram tratados separadamente por via subcutânea (s.c.) com indometacina (30 mg/kg). Após 30 minutos, receberam a injeção de solução de formalina na concentração de 1%, e durante 30 minutos foram avaliados os indicadores de nociceção.

5.3.5 Recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal

Para avaliar a atividade anti-inflamatória, os três grupos experimentais tratamento e controle foram submetidos ao teste de recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal, após a administração intraperitoneal do estímulo álgico carragenina. Os animais foram eutanasiados após 4 horas da injeção de carragenina (500µg/200µL por 20g peso camundongo) (NUNES et al., 2009), e o lavado peritoneal foi realizado com PBS acrescido de EDTA. A contagem total de células foi realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer, e a contagem diferencial foi realizada pelo preparo de esfregaços em citocentrífuga, os quais foram corados por corante Panótico e as células diferenciadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 1000x). As citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10 também foram dosadas a partir do lavado peritoneal através do ensaio imunoenzimático (ELISA), conforme protocolo do fabricante (R&D Systems[®], Minneapolis, Estados Unidos da América).

5.4 Avaliação da variação do peso corporal das fêmeas tratadas oralmente durante a gestação e lactação com *L. plantarum* Lp62 e dos seus filhotes não tratados durante o experimento

Para avaliar alterações de peso dos animais durante o experimento, as fêmeas tratadas durante a gestação e lactação com *L. plantarum* Lp62 e os seus respectivos filhotes não tratados foram pesados separadamente em balança analítica 24h após o parto e no último dia de amamentação (21º dia). No grupo controle, as fêmeas foram tratadas com solução salina (0,9%) durante a gestação e lactação. A alteração do peso das fêmeas e dos filhotes foi calculada através da diferença da média do peso do 21º dia com a média do peso de 24h após o parto (2º dia). O peso dos filhotes 24h após o nascimento também foi avaliado.

5.5 Avaliação do efeito toxicológico do tratamento oral de *L. plantarum* Lp62 no modelo experimental animal

Para avaliar o efeito toxicológico do tratamento por via oral de *L. plantarum* Lp62, os seguintes órgãos foram removidos e pesados: as adrenais, o baço, coração, estômago, fígado, ovários e útero (fêmeas), pâncreas, pulmões, rins e timo. Também foi realizada avaliação macroscópica dos tecidos para observar se havia alguma lesão de intoxicação visível. Os órgãos foram retirados dos machos adultos tratados por sete dias, das fêmeas tratadas durante a gestação e lactação, e dos machos adultos, provenientes da ninhada de fêmeas tratadas durante a gestação e lactação. Os órgãos foram pesados separadamente em balança analítica, sendo o resultado obtido em gramas. Os animais também foram observados durante os tratamentos com *L. plantarum* Lp62 ou salina 0,9%. Foi realizada avaliação dos sinais, onde a observação das alterações comportamentais nos animais foi baseada no screening hipocrático. Os fatores avaliados foram: atividade geral, motilidade, piloereção, exoftalmia, lambar patas, hipnose, coçar focinho, morder cauda, convulsão clônica/tônica, tremores finos/grosseiros, ereção da cauda (straub), tremor da cauda, sedação, catatonia, anestesia, ataxia. Em relação à micção, foi observado se houve alteração da coloração da urina. Outros possíveis efeitos que foram observados foram diarreia, contorção, reação de fuga, agressividade e guinchar/chiar (frênito vocal) e morte (COSTA, 2013).

5.6 Análise estatística

Todas as variáveis foram testadas quanto à distribuição normal e variância homogênea. Para os dados com duas variáveis foram utilizados o teste t de Student ou o seu equivalente não-paramétrico teste de Mann-Whitney. Para os dados com três ou mais variáveis foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido por comparações múltiplas pelo teste de Dunn's. Para todas as análises foi utilizado o programa GraphPad Prism[®] versão 5.00 (GraphPad[®], La Jolla, CA92037, USA). Valores foram considerados significantes quando apresentaram $p < 0,05$.

REFERÊNCIAS

- AAGAARD, K. et al. The placenta harbors a unique microbiome. **Sci Transl Med**, v. 6, n. 237, p. 237ra65, 2014.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia básica. Funções e distúrbios do sistema imunológico**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.
- ABRAHAMSSON, T. R. et al. Probiotic lactobacilli in breast milk and infant stool in relation to oral intake during the first year of life. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 49, n. 3, p. 349–354, 2009.
- ADAWI, D. et al. Safety of the Probiotic Strain *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (= strain 299v) in an Endocarditis Animal Model. **Microb Ecol Health Dis**, v. 14, p. 50–53, 2002.
- ADLERBERTH, I.; WOLD, A. E. Establishment of the gut microbiota in Western infants. **Acta Paediatr**, v. 98, n. 2, p. 229–238, 2009.
- AGARWAL, S. et al. Immune markers in breast milk and fetal and maternal body fluids: a systematic review of perinatal concentrations. **J Hum Lact**, v. 27, n. 2, p. 171–186, 2011.
- AGOSTONI, C. et al. Prebiotic oligosaccharides in dietetic products for infants: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 39, n. 5, p. 465–473, 2004.
- AHLUWALIA, B.; MAGNUSSON, M. K.; ÖHMAN, L. Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad. **Scand J Gastroenterol**, v. 52, n. 11, p. 1185–1193, 2017.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nat Immunol**, v. 2, n. 8, p. 675–680, 2001.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: A neuroanatomical review. **Brain Res**, v. 1000, p. 40–56, 2004.
- ARENA, M. P. et al. The potential of lactic acid bacteria to colonize biotic and abiotic surfaces and the investigation of their interactions and mechanisms. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 101, n. 7, p. 2641–2657, 2017.
- ARROYO, R. et al. Treatment of infectious mastitis during lactation : antibiotics versus oral administration of lactobacilli isolated from breast milk. **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 12, p. 1551–1558, 2010.
- BÄCKHED, F. Programming of host metabolism by the gut microbiota. **Ann Nutr Metab**, v. 58, p. 44–52, 2011.
- BALDASSARRE, M. E. et al. Administration of a multi-strain probiotic product to women in the perinatal period differentially affects the breast milk cytokine profile and may have beneficial effects on neonatal gastrointestinal functional symptoms. A randomized clinical trial. **Nutrients**, v. 8, n. 11, p. 1–13, 2016.
- BALLARD, O.; MORROW, A. L. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. **Pediatr Clin North Am**, v. 60, n. 1, p. 49–74, 2013.
- BARRETT, E. et al. Gamma-Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. **J Appl Microbiol**, v. 113, n. 2, p. 411–417, 2012.
- BARTON, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune

- system. **J Clin Invest**, v. 118, n. 2, p. 413–420, 2008.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–284, 2009.
- BÄUMLER, A. J.; SPERANDIO, V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 85–93, 2016.
- BEARFIELD, C. et al. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. **BJOG**, v. 109, n. 5, p. 527–533, 2002.
- BENGMARK, S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. **Gut**, v. 42, n. 1, p. 2–7, 1998.
- BENSON, C. et al. Biogenic amines and the amino acids GABA and glutamate: Relationships with pain and depression. **Mod Trends in Pharmacopsychiatry**, v. 30, p. 67–79, 2015.
- BERTELSEN, R. J. et al. Probiotic milk consumption in pregnancy and infancy and subsequent childhood allergic diseases. **J Allergy Clin Immunol**, v. 133, n. 1, p. 165–171, 2014.
- BESTEN, G. DEN et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **J Lipid Res**, v. 54, n. 9, p. 2325–2340, 2013.
- BINNS, N. **Monografias Concisas ILSI Europe: Probióticos, Prebióticos e a Microbiota Intestinal**. São Paulo: ILSI Brasil, 2014.
- BIXQUERT JIMENEZ, M. Treatment of irritable bowel syndrome with probiotics. An etiopathogenic approach at last? **Rev Esp Enferm Dig**, v. 101, n. 8, p. 553–564, 2009.
- BOND, D. M.; MORRIS, J. M.; NASSAR, N. Study protocol : evaluation of the probiotic *Lactobacillus Fermentum* CECT5716 for the prevention of mastitis in breastfeeding women : a randomised controlled trial. **BMC Pregnancy Childbirth**, v. 17, n. 148, p. 1–8, 2017.
- BOUSKRA, D. et al. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. **Nature**, v. 456, p. 507–510, 2008.
- BRAVO, J. A. et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 108, n. 38, p. 16050–16055, 2011.
- CACHO, N. T.; LAWRENCE, R. M. Innate immunity and breast milk. **Front Immunol**, v. 8, n. 584, p. 1–10, 2017.
- CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. **Crit Rev Microbiol**, v. 28, n. 4, p. 281–370, 2002.
- CHEVALLIER, B.; HUBERT, J. C.; KAMMERER, B. Determination of Chromosome Size and Number of *Rrn* Loci in *Lactobacillus-Plantarum* by Pulsed-Field Gel-Electrophoresis. **FEMS Microbiol Lett**, v. 120, n. 1–2, p. 51–56, 1994.
- CHIANG, S.; PAN, T. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp . *paracasei* NTU 101 and its fermented products. **Appl Micr**, v. 93, n. 3, p. 903–916, 2012.
- COLLADO, M. C. et al. Effect of mother’s weight on infant’s microbiota acquisition , composition , and activity during early infancy : a prospective follow-up study initiated in early pregnancy. **Am J Clin Nutr**, v. 92, p. 1023–1030, 2010.
- COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune Probiotics and immune response. **Cienc Rural**, v. 34, n. 4, p. 1297–1303, 2004.

- COSTA, T. N. **Avaliação da toxicidade aguda e subcrônica do *Aspidosperma subincanum* (Apocynaceae) em camudongos.** [s.l.] Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.
- COUTAUX, A. et al. Hyperalgesia and allodynia: Peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, n. 5, p. 359–371, 2005.
- CROSS, S. A. Pathophysiology of Pain. **Mayo Clin Proc**, v. 69, p. 375–383, 1994.
- D'ANGELO, C.; REALE, M.; COSTANTINI, E. Microbiota and probiotics in health and HIV infection. **Nutrients**, v. 9, n. 6, p. 1–15, 2017.
- DAI, Y.-J. et al. Potential beneficial effects of probiotics on human migraine headache: a literature review. **Pain physician**, v. 20, n. 2, p. E251–E255, 2017.
- DAVID, L. A. et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 559–563, 2014.
- DAVIS, D. J. et al. Lactobacillus plantarum attenuates anxiety-related behavior and protects against stress-induced dysbiosis in adult zebrafish. **Sci Rep**, v. 6, n. 33726, p. 1–11, 2016.
- DE VRIES, M. C. et al. Lactobacillus plantarum-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. **Int Dairy J**, v. 16, n. 9, p. 1018–1028, 2006.
- DEMMELMAIR, H.; VON ROSEN, J.; KOLETZKO, B. Long-term consequences of early nutrition. **Early Hum Dev**, v. 82, n. 8, p. 567–574, 2006.
- DI MAURO, A. et al. Gastrointestinal function development and microbiota. **Ital J Pediatr**, v. 39, n. 1, p. 1–15, 2013.
- DIAZ-ROPERO, M. P. et al. Two Lactobacillus strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. **J Appl Microbiol**, v. 102, n. 2, p. 337–343, 2007.
- DOEGE, K. et al. Impact of maternal supplementation with probiotics during pregnancy on atopic eczema in childhood--a meta-analysis. **Br J Nutr**, v. 107, n. 1, p. 1–6, 2012.
- DONALDSON, G. P.; LEE, S. M.; MAZMANIAN, S. K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nat Rev Microbiol**, v. 14, n. 1, p. 20–32, 2016.
- DOS SANTOS, T. F. et al. Efficacy of oral administration of lactic acid bacteria isolated from cocoa in a fermented milk preparation: reduction of colitis in an experimental rat model. **Genet Mol Res**, v. 15, n. 3, p. 1–13, 2016.
- DRAKES, M.; BLANCHARD, T.; CZINN, S. Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. **Infect Immun**, v. 72, n. 6, p. 3299–3309, 2004.
- DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: The sensors of the pain pathway. **J Clin Invest**, v. 120, n. 11, p. 3760–3772, 2010.
- DUNCKER, S. C. et al. The D-alanine content of lipoteichoic acid is crucial for Lactobacillus plantarum-mediated protection from visceral pain perception in a rat colorectal distension model. **Neurogastroenterol Motil**, v. 20, n. 7, p. 843–850, 2008.
- DUNNE, C. et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin : correlation with in vivo findings. **Am J Clin Nutr**, v. 73, p. 386S–392S, 2001.
- ELSHAGHABEE, F. M. F. et al. Bacillus as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. **Front Microbiol**, v. 8, n. 1490, p. 1–15, 2017.
- EVIVIE, S. E. et al. Some current applications, limitations and future perspectives of lactic acid bacteria as probiotics. **Food Nutr Res**, v. 61, n. 1, p. 1–16, 2017.

- FAO/OMS. Probiotics in food. **Food and Nutrition Paper**, v. 85, p. 71, 2001.
- FASANO, A.; SHEA-DONOHUE, T. Mechanisms of Disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. **Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol**, v. 2, n. 9, p. 416–422, 2005.
- FERNÁNDEZ, L. et al. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. **Pharmacol Res**, v. 69, n. 1, p. 1–10, 2012.
- FITZSTEVENS, J. L. et al. Systematic review of the human milk microbiota. **Nutr Clin Pract**, v. 20, n. 10, p. 1–11, 2016.
- FORSYTHE, P.; KUNZE, W. A. Voices from within: Gut microbes and the CNS. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 1, p. 55–69, 2013.
- FOSTER, J. A. et al. Gut microbiota and brain function: An evolving field in neuroscience. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 19, n. 5, p. 1–7, 2016.
- FRIEDRICH, A. D. et al. Message in a bottle: Dialog between intestine and skin modulated by probiotics. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 6, p. 1–11, 2017.
- FUJIO-VEJAR, S. et al. The gut microbiota of healthy chilean subjects reveals a high abundance of the phylum Verrucomicrobia. **Front Microbiol**, v. 8, n. 1221, p. 1–11, 2017.
- GALDEANO, C. M. et al. Stimulation of innate immune cells induced by probiotics: participation of Toll-Like receptors. **J CliniCell Immunol**, v. 6, n. 1, p. 1–9, 2015.
- GAROFALO, R. Cytokines in human milk. **J Pediatr**, v. 156, n. 2, p. S36–S40, 2010.
- GENSOLLEN, T. et al. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. **Science**, v. 352, n. 6285, p. 539–544, 2016.
- GERRITSEN, J. et al. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. **Genes Nutr**, v. 6, p. 209–240, 2011.
- GOLD, M. S.; GEBHART, G. F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. **Nat Med**, v. 16, n. 11, p. 1248–1257, 2010.
- GREDEL, S. **Monografias Concisas ILSI Europe: Nutrição e imunidade no homem**. 2. ed. São Paulo: ILSI Brasil, 2012.
- GRUYS, E. et al. Acute phase reaction and acute phase proteins. **J Zhejiang Univ Sci**, v. 6, n. 11, p. 1045–56, 2005.
- GUARNER, F. et al. Probióticos e prebióticos. **World Gastroenterology Organisation**, p. 1–29, 2011.
- GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v. 361, n. 9356, p. 512–519, 2003.
- HANSEN, C. H. F. et al. Patterns of early gut colonization shape future immune responses of the host. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1–7, 2012.
- HANSEN, C. H. F.; METZDORFF, S. B.; HANSEN, A. K. Customizing laboratory mice by modifying gut microbiota and host immunity in an early ‘window of opportunity’. **Gut Microbes**, v. 4, n. 3, p. 241–245, 2013.
- HANSON, L. Å. Symposium on ‘Nutrition in early life: new horizons in a new century’. Session 1: Feeding and infant development Breast-feeding and immune function. **Proc Nutr Soc**, v. 66, n. 3, p. 384–396, 2007.

- HEIJTZ, R. D. et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 108, n. 7, p. 3047–3052, 2011.
- HEIKKILÄ, M. P.; SARIS, P. E. J. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. **J Appl Microbiol**, v. 95, n. 3, p. 471–8, 2003.
- HENNESSY, M. B.; SCHIML-WEBB, P. A.; DEAK, T. Separation, sickness, and depression: A new perspective on an old animal model. **Curr Dir Psychol Sci**, v. 18, n. 4, p. 227–231, 2009.
- HU, J. et al. Diversified microbiota of meconium is affected by maternal diabetes status. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–10, 2013.
- ILMONEN, J. et al. Impact of dietary counselling and probiotic intervention on maternal anthropometric measurements during and after pregnancy : A randomized placebo-controlled trial. **Clin Nutr**, v. 30, p. 156–164, 2011.
- JANDHYALA, S. M. et al. Role of the normal gut microbiota. **World J Gastroenterol**, v. 21, n. 29, p. 8836–8847, 2015.
- JI, R.-R.; CHAMESSIAN, A.; ZHANG, Y.-Q. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation ru-rong. **Science**, v. 354, n. 6312, p. 572–577, 2016.
- JI, R.-R.; XU, Z.-Z.; GAO, Y.-J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain Ru-Rong. **Nat Rev Drug Discov**, v. 13, n. 7, p. 533–548, 2014.
- JIMENEZ, E. et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. **Curr Microbiol**, v. 51, n. 4, p. 270–274, 2005.
- JIMENEZ, E. et al. Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors. **Res Microbiol**, v. 159, n. 9–10, p. 595–601, 2008a.
- JIMENEZ, E. et al. *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. **BMC Microbiol**, v. 8, p. 143, Sep. 2008b.
- JIMÉNEZ, E. et al. Oral administration of lactobacillus strains Isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, n. 15, p. 4650–4655, 2008.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203–210, 2001.
- KAMIYA, T. et al. Inhibitory effects of *Lactobacillus reuteri* on visceral pain induced by colorectal distension in Sprague-Dawley rats. **Gut**, v. 55, n. 2, p. 191–6, 2006.
- KARLSSON, C. L. J. et al. Effects on weight gain and gut microbiota in rats given bacterial supplements and a high-energy-dense diet from fetal life through to 6 months of age. **Br J Nutr**, v. 106, n. 6, p. 887–895, 2011.
- KLEEREBEZEM, M. et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, n. 4, p. 1990–5, 2003.
- KLEIN, G. et al. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **Int J Food Microbiol**, v. 41, n. 2, p. 103–125, 1998.
- KOLE, A.; MALOY, K. J. Control of intestinal inflammation by interleukin-10. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 380, p. 19–38, 2014.
- KOREN, O. et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during

pregnancy. **Cell**, v. 150, n. 3, p. 470–480, 2012.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BOER, E. DE. Acetic acid for analgesic screening. **Fed Proc**, v. 18, p. 412–416, 1959.

KRISTENSEN, N. B. et al. Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials. **Genome Med**, v. 8, n. 52, p. 1–11, 2016.

LAMMERS, K. M. et al. Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 38, n. 2, p. 165–172, 2003.

LANE, E. R.; ZISMAN, T. L.; SUSKIND, D. L. The microbiota in inflammatory bowel disease: Current and therapeutic insights. **J Inflamm Res**, v. 10, p. 63–73, 2017.

LANGA, S. **Interactions between lactic acid bacteria, intestinal epithelial cells and immune cells: development of in vitro models**. [s.l.] Complutense University of Madrid, Madrid (Spain), 2006.

LANGA, S. et al. Characterization of *Lactobacillus salivarius* CECT 5713 , a strain isolated from human milk : from genotype to phenotype. **ppl Microbiol Biotechnol**, v. 94, p. 1279–1287, 2012.

LEBLANC, J. G. et al. Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. **Microb Cell Fact**, v. 16, n. 79, p. 1–10, 2017.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Tetrahymena favored the growth of. **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747–748, 1965.

LINARES, D. M. et al. Lactic acid bacteria and bifidobacteria with potential to design natural biofunctional health-promoting dairy foods. **Front Microbiol**, v. 8, n. 846, p. 1–11, 2017.

MACPHERSON, A. J.; UHR, T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. **Science**, v. 303, n. 5664, p. 1662–1665, 2004.

MARQUES, T. M. et al. Programming infant gut microbiota: Influence of dietary and environmental factors. **Curr Opin Biotechnol**, v. 21, n. 2, p. 149–156, 2010.

MARTIN, R. M. et al. Breast-feeding and childhood cancer: A systematic review with metaanalysis. **Int J Cancer**, v. 117, n. 6, p. 1020–1031, Dec. 2005.

MARTIN, R. M.; GUNNELL, D.; SMITH, G. D. Breastfeeding in infancy and blood pressure in later life: systematic review and meta-analysis. **Am J Epidemiol**, v. 161, n. 1, p. 15–26, 2005.

MARTIN, V. et al. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. **J Hum Lact**, v. 28, n. 1, p. 36–44, 2012.

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 819–26, 2007.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428–435, 2008.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771–776, 2010.

MESSIAS, G. C. **Avaliação da atividade galactagoga do microrganismo probiótico**

Lactobacillus plantarum isolado da fermentação de amêndoas de cacau. [s.l.]

Dissertação, Universidade Federal da Bahia, 2017.

MILANI, C. et al. The human gut microbiota and its interactive connections to diet. **J Hum Nutr Diet**, v. 29, n. 5, p. 539–546, 2016.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol**, v. 66, n. 6, p. 355–474, 2002.

MOHAMADZADEH, M. et al. Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, n. 8, p. 2880–2885, 2005.

MORROW, A. L.; RANGEL, J. M. Human milk protection against infectious diarrhea: Implications for prevention and clinical care. **Semin Pediatr Infect Dis**, v. 15, n. 4, p. 221–228, 2004.

MOWAT, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 4, p. 331–41, 2003.

NATIVIDAD, J. M. M.; VERDU, E. F. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: Pathological and therapeutic implications. **Pharmacol Res**, v. 69, n. 1, p. 42–51, 2013.

NEWBOURG, D. Innate immunity and human milk. **J Nutr**, v. 135, p. 1308–12, 2005.

NEWBURG, D. S.; MORELLI, L. Human milk and infant intestinal mucosal glycans guide succession of the neonatal intestinal microbiota. **Pediatr Res**, v. 77, n. 1–2, p. 115–20, 2015.

NOBAEK, S. et al. Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. **Am J Gastroenterol**, v. 95, n. 5, p. 1231–1238, May 2000.

NUNES, B. S. et al. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 379, n. 6, p. 609–616, 2009.

OLIVARES, M. et al. Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. **Nutrition**, v. 23, n. 3, p. 254–260, 2007.

OSTMAN, S. et al. Impaired regulatory T cell function in germ-free mice. **Eur J Immunol**, v. 36, p. 2336–2346, 2006.

PALMEIRA, P.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. Immunology of breast milk. **Rev Asso Med Bras**, v. 62, n. 6, p. 584–593, 2016.

PALMER, C. et al. Development of the human infant intestinal microbiota. **PLoS Biology**, v. 5, n. 7, p. 1556–1573, 2007.

PATHMAKANTHAN, S. et al. *Lactobacillus plantarum* 299: beneficial in vitro immunomodulation in cells extracted from inflamed human colon. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 19, n. 2, p. 166–173, Feb. 2004.

PENDERS, J. et al. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy : the KOALA Birth Cohort Study. **Gut**, v. 56, p. 661–667, 2007.

PEREZ, P. F. et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? **Pediatrics**, v. 119, n. 3, p. e724–32, 2007.

PERON, J. P. S.; DE OLIVEIRA, A. P. L.; RIZZO, L. V. It takes guts for tolerance: the phenomenon of oral tolerance and the regulation of autoimmune response. **Autoimmun Rev**, v. 9, n. 1, p. 1–4, 2009.

- PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 3, p. 141–53, 2014.
- PINEIRO, M.; STANTON, C. Probiotic bacteria: legislative framework-requirements to evidence basis. **J Nutr**, v. 137, n. 3, p. 850S–853, 2007.
- PLAZA-DÍAZ, J. et al. Evidence of the anti-inflammatory effects of probiotics and synbiotics in intestinal chronic diseases. **Nutrients**, v. 9, n. 6, p. 1–19, 2017.
- RABET, L. M. et al. Breast-feeding and its role in early development of the immune system in infants: consequences for health later in life. **J Nutr**, v. 138, p. 1782S–1790S, 2008.
- REIGSTAD, C. S. et al. Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. **FASEB J**, v. 29, n. 4, p. 1395–1403, 2015.
- RESCIGNO, M. et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. **Nat Immunol**, v. 2, n. 4, p. 361–367, 2001.
- RHEE, S. H.; POTHOUKAKIS, C.; MAYER, E. A. Principles and clinical implications of the brain–gut–enteric microbiota axis. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 6, n. 5, p. 1–19, 2009.
- RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Z Rheumatol**, v. 60, p. 404–415, 2001.
- RIJKERS, G. T. et al. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: current status and recommendations for future research. **J Nutr**, v. 140, n. 3, p. 671S–676S, 2010.
- ROCHA, A. P. C. et al. Dor - Aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Rev Bras Anestesiol**, v. 57, n. 1, p. 94–105, 2007.
- RODRÍGUEZ, J. M. The origin of human milk bacteria : is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? **Adv Nutr**, v. 5, p. 779–784, 2014.
- RODRÍGUEZ, J. M. et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. **Microb Ecol Health Dis**, v. 26, n. 26050, p. 1–17, 2015.
- ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiome shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 5, p. 313–323, 2009.
- ROUSSEAU, C. et al. Lactobacillus acidophilus modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. **Nat Med**, v. 13, n. 1, p. 35–37, 2007.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Rev Bras Cienc Farm**, v. 42, p. 1–16, 2006.
- SALVETTI, E.; TOOLE, P. W. O. The genomic basis of Lactobacilli as health-promoting organisms. **Microbiol Spectr**, v. 5, n. 3, p. 1–17, 2017.
- SALVETTI, E.; TORRIANI, S.; FELIS, G. E. The genus Lactobacillus : a taxonomic update. **Probiotics Antimicrob Proteins**, v. 4, n. 4, p. 217–226, 2012.
- SANTACRUZ, A. et al. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. **Br J Nutr**, v. 104, n. 1, p. 83–92, 2010.
- SANTOS, T. F. DOS et al. Immunomodulatory effects of Lactobacillus plantarum Lp62 on intestinal epithelial and mononuclear cells. **Biomed Res Int**, v. 2016, p. 1–8, 2016.
- SANZ, Y. Gut microbiota and probiotics in maternal and infant health. **Am J Clin Nutr**, v. 94, p. 2000S–2005S, 2011.

- SASSONE-CORSI, M.; RAFFATELLU, M. No Vacancy: how beneficial microbes cooperate with immunity to provide colonization resistance to pathogens. **J Immunol**, v. 194, n. 9, p. 4081–4087, 2015.
- SAUER, M. et al. The efficient clade : lactic acid bacteria for industrial chemical production. **Trends Biotechnol**, v. 35, n. 8, p. 756–769, 2017.
- SEIDMAN, E. G.; BERNOTTI, S.; LEVY, E. Nutritional modulation of gut inflammation. **Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme**, v. 7, p. 41–65, 2002.
- SERHAN, C. N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 101–137, 2007.
- SHI, N. et al. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. **Mil Med Res**, v. 4, n. 14, p. 1–7, 2017.
- SIEZEN, R. J.; VAN HYLCKAMA VLIEG, J. E. T. Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. **Microb Cell Fact**, v. 10, p. 1–13, 2011.
- SINGHAL, A. et al. Breastmilk feeding and lipoprotein profile in adolescents born preterm: follow-up of a prospective randomised study. **Lancet**, v. 363, n. 9421, p. 1571–1578, May 2004.
- SINGHAL, A.; LUCAS, A. Early origins of cardiovascular disease: is there a unifying hypothesis? **Lancet**, v. 363, n. 9421, p. 1642–1645, 2004.
- SLAVICH, G. M.; IRWIN, M. R. From stress to inflammation and major depressive disorder a social signal transduction theory of depression. **Psychol Bull**, v. 140, n. 3, p. 774–815, 2014.
- SOHN, K.; UNDERWOOD, M. A. Seminars in fetal & neonatal medicine prenatal and postnatal administration of prebiotics and probiotics. **Semin Fetal Neonatal Med**, v. 30, p. 1–6, 2017.
- SOMMER, F.; BÄCKHED, F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. **Nat Rev Microbiol**, v. 11, p. 227–38, 2013.
- STAMFORD, J. A. Descending control of pain. **Br J Anaesth**, v. 75, n. 2, p. 217–227, 1995.
- THUM, C. et al. Can nutritional modulation of maternal intestinal microbiota influence the development of the infant gastrointestinal tract? **J Nutr**, v. 142, n. 11, p. 1921–1928, 2012.
- THURSBY, E.; JUGE, N. Introduction to the human gut microbiota. **Biochem J**, v. 474, n. 11, p. 1823–1836, 2017.
- TJØLSEN, A. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5–17, 1992.
- TSAI, Y. et al. International immunopharmacology effect of the administration of *Lactobacillus paracasei* subsp . *paracasei* NTU 101 on Peyer's patch-mediated mucosal immunity. **Int Immunopharmacol**, v. 10, n. 7, p. 791–798, 2010.
- VACHER, P. J.; MARULLAZ, D. P.; BARBOT, P. A propos de quelques produits usuels. Comparaison de deux méthodes d'étude des analgésiques. **Med Exp**, v. 11, p. 51–58, 1964.
- VANDENPLAS, Y. et al. Probiotics and prebiotics in prevention and treatment of diseases in infants and children. **J Pediatr**, v. 87, n. 4, p. 292–300, 2011.
- VAZQUEZ-TORRES, A. et al. Extraintestinal dissemination CD18-expressing phagocytes.

Nature, v. 401, p. 804–808, 1999.

VERNA, E. C.; LUCAK, S. Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? **Ther Adv Gastroenterol**, v. 3, n. 5, p. 307–319, 2010.

VICTORA, C. G. et al. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. **Lancet**, v. 387, n. 10017, p. 475–490, 2016.

VINDEROLA, G. et al. Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirianofaciens* on the gut mucosal immunity. **Cytokine**, v. 36, n. 5–6, p. 254–260, 2007.

VOREADES, N.; KOZIL, A.; WEIR, T. L. Diet and the development of the human intestinal microbiome. **Front Microbiol**, v. 5, p. 1–9, 2014.

VOS, A. P. et al. Immune-modulatory effects and potential working mechanisms of orally applied nondigestible carbohydrates. **Crit Rev Immunol**, v. 27, n. 2, p. 97–140, 2007.

WALL, R. et al. Role of gut microbiota in early infant development. **Clin Med Pediatr**, v. 3, p. 45–54, 2009.

WANG, H. et al. Effect of probiotics on central nervous system functions in animals and humans: A systematic review. **J Neurogastroenterol Motil**, v. 22, n. 4, p. 589–605, 2016.

WANG, X. et al. Development of human breast milk microbiota-associated mice as a method to identify breast milk bacteria capable of colonizing gut. **Front Microbiol**, v. 8, n. 1242, p. 1–13, 2017.

WITKOWSKA-ZIMNY, M.; KAMINSKA-EL-HASSAN, E. Cells of human breast milk. **Cell Mol Biol Lett**, v. 22, n. 1, p. 1–11, 2017.

YAO, P. et al. Effects of probiotics on Toll-like receptor expression in ulcerative colitis rats induced by 2,4,6-trinitro-benzene sulfonic acid. **Mol Med Rep**, v. 15, n. 4, p. 1973–1980, 2017.

YATSUNENKO, T. et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 222–227, 2012.

Anti-inflammatory and antinociceptive activity of *Lactobacillus plantarum* Lp62 in experimental animal model

Aracely Vieira de Melo¹, Gabriel Vinderola², Regiane Yatsuda¹

1 Multidisciplinary Institute for Health, Federal University of Bahia, Vitória da Conquista, Bahia State, Brazil.

2 Faculty of Chemical Engineering, Institute of Industrial Lactology (INLAIN, UNL-CONICET), National University of Santa Fe Litoral, Argentina.

Abstract

Purpose Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the oral administration of *Lactobacillus plantarum* Lp62, isolated from the fermentation of cocoa beans, were evaluated in experimental animal model.

Methods Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of *L. plantarum* Lp62 were performed by the writhing test (acetic acid), intraplantar injection of formalin, neutrophil recruitment to the peritoneal cavity, and determination of cytokine concentration (TNF- α , IL-1 β and IL-10). For all tests, three experimental groups of *Balb* /C mice were used: adult males treated for seven days (AMT), females treated during gestation and lactation (FGL), and untreated males (UM) from the litter of FGL. Animals received orally 0.9% saline solution or bacterial suspension of Lp62 (1.44×10^9 CFU/0.2 mL/daily). Toxicological effects of Lp62 were also evaluated.

Results Lp62 showed significant reduction of writhing number for the three groups, reduction in neurogenic phase in AMT and FGL, and reduction in the recruitment of neutrophils in AMT ($p < 0.05$). FGL and the pups showed reduction of body weight, and of kidneys and ovaries plus uterus weight ($p < 0.05$). In all experimental groups, no macrolesions, behavioral changes and death were observed.

Conclusions The oral treatment with *L. plantarum* Lp62 showed antinociceptive effects mainly on the neurogenic phase in females and adult's male group and reduction of edema originating from neurogenic nociception. The effects of *L. plantarum* Lp62 were lower in the adults male mice untreated from the litter of females treated. Thus, the present study provided evidence that the *L. plantarum* Lp62 has anti-inflammatory and antinociceptive activities when orally administered to the mice, and more studies should be conducted to better elucidate their mechanism of action and toxicology.

Keywords: *Lactobacillus*, probiotics, mice, nociception, inflammation.

Introduction

The gastrointestinal tract (GI) microbiota performs metabolic, nutritional, physiological and immunological activities in the human body, playing an important role in human health. Variations in the composition of the microbiota have been recognized in several diseases [1, 2], leading to a growing development of research using the gut microbiota as a potential modifiable factor for the development of diseases [3]. In this sense, the use of probiotics becomes a viable alternative to restore the health of an altered microbiome [4].

The World Health Organization defines probiotics as live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host [5]. The benefits provided to host health through the ingestion of probiotic cultures are related to the improvement of intestinal barrier function through effects on the epithelium and mucus lining; stabilization of the gut microbiota after the use of antibiotics; gastrointestinal resistance to pathogen colonization; reduction of the population of pathogens through the production of acetic and lactic acids, bacteriocins and other antimicrobial compounds; digestion of lactose intolerant individuals; constipation relief; increased absorption of minerals; production of vitamins and stimulation of the immune system [6, 7].

Oral administration of probiotic microorganisms during pregnancy and lactation is also an effective strategy to modulate the composition of the microbiota and reduce the risk of infections and

diseases in both mothers and children [8, 9]. Transmission of bacteria from the mother to the newborn through direct contact with the maternal microbiota during birth and through breast milk during lactation influences the intestinal colonization of the child, with potential health consequences [10].

Lactobacillus plantarum is a species of lactic acid bacterium used as probiotic, and can be found in fermented foods, preserves, vegetables, meats, fish, silage and GI. It is a gram-positive, microaerophilic, facultative heterofermentative microorganism, which produces acetate and lactate and has the ability to catabolize arginine, and produce nitric oxide (NO), being a microorganism entirely dependent on the availability of glucose and arginine to its growth [11, 12]. In the last decade, there has been an increasing number of studies aimed at deciphering the potential beneficial effects of treatment with *L. plantarum* strains on human health [13], including anti-inflammatory [14] and antinociceptive activities [15]. *Lactobacillus plantarum* Lp62 was isolated from the spontaneous fermentation of cocoa beans in the region of Ilhéus-Itabuna/Bahia – Brazil [16], and previous studies have evaluated its anti-inflammatory effects demonstrating the probiotic potential of this strain [17, 18].

The beneficial effects of probiotics are directly and exclusively related to the type of strain used [19]. Thus, considering the recognize importance of the effects of probiotic microorganisms on health, especially the influence of the intestinal microbiota on the immune system and the modulation of this microbiota, and the probiotic potential of *L. plantarum* Lp62, the objective of this study was to evaluate the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the oral administration of *L. plantarum* Lp62 in experimental animal model.

Materials and Methods

Microorganism

L. plantarum Lp62 were isolated from the fermentation of cocoa beans and identified by 16S rRNA gene sequencing (GenBank access number KU291427) [16] and it was donated by the microbial biotechnology laboratory of State University of Santa Cruz (UESC). The strain was grown in MRS broth at 37°C, 5% CO₂ for 24h and plated on MRS agar for enumeration of viable bacteria. A growth curve was performed in MRS broth at 37°C and 5% CO₂. The microbial growth curve was determined by spectrophotometry at 630 nm and the viable cell count was determined by serial dilutions and plating in agar MRS medium. The maximal growth rendered 10⁹ CFU/mL of the strain under study [20], and it was obtained after 12 hours of growth. Bacteria were inoculated daily in MRS medium after *L. plantarum* Lp62 growth at 37°C and 5% CO₂ for 12 hours and given to the treatment group.

Animals

All experiments were performed with *Balb/C* mice (20–25 g) obtained and maintained at the Animal Facility at Multidisciplinary Health Institute of Federal University of Bahia. The animals were maintained in a temperature controlled room (22 ± 2°C) with controlled humidity (50–70%) and a 12 h light/dark cycle. The animals were kept in polypropylene boxes containing wood shavings at the base of the box with free access to food (Labina®, Purina) and filtered water. The mice were evenly distributed among the groups. At the end of the experiments, the animals were anesthetized with 60 mg/kg ketamine plus 7.5 mg/kg xylazine, and euthanized by anesthetic depth. Animal care and research protocols were in accordance with the principles and guidelines adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), and the study was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Federal University of Bahia, with protocol number 035/2015.

Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activity of *L. plantarum* Lp62 in experimental animal model

For all anti-inflammatory and antinociceptive tests, three experimental groups of *Balb/C* mice were used. The first study group consisted of adult male mice (3 months) (total n = 12, control and treatment) treated by gavage for a period of seven days (Figure 1).

The second group consisted of female mice treated during gestation and lactation (total n = 12, control and treatment) (Figure 1). The females started the treatment by gavage one week before the

expected date of delivery, continuing through the lactation period until the day of weaning (21th day). Within the first 24 hours of birth, litter was adjusted, and each mother had the same number of male pups (n = 4). Male mice from the litter of females treated during gestation and lactation were the third study group and had no treatment by gavage (total n = 48, control and treatment) (Figure 1). For each of the tests performed, the control group received 0.2 ml of 0.9% saline solution and the treatment group received 0.2 ml of bacterial suspension by oral gavage of the probiotic microorganism (1.44×10^9 CFU/0.2 mL/daily) (Figure 1). Male *Balb/C* mice treated for seven days, and female *Balb/C* mice treated during gestation and lactation were evaluated for anti-inflammatory and antinociceptive activities on the eighth day, and one the day after the last day of lactation - 21st day, respectively. Male *Balb/C* mice from females treated during gestation and lactation were tested three months after their birth in adulthood, being the control group from females treated with 0.9% saline solution, and the treatment group from females treated with bacterial suspension of the probiotic microorganism (Figure 1).

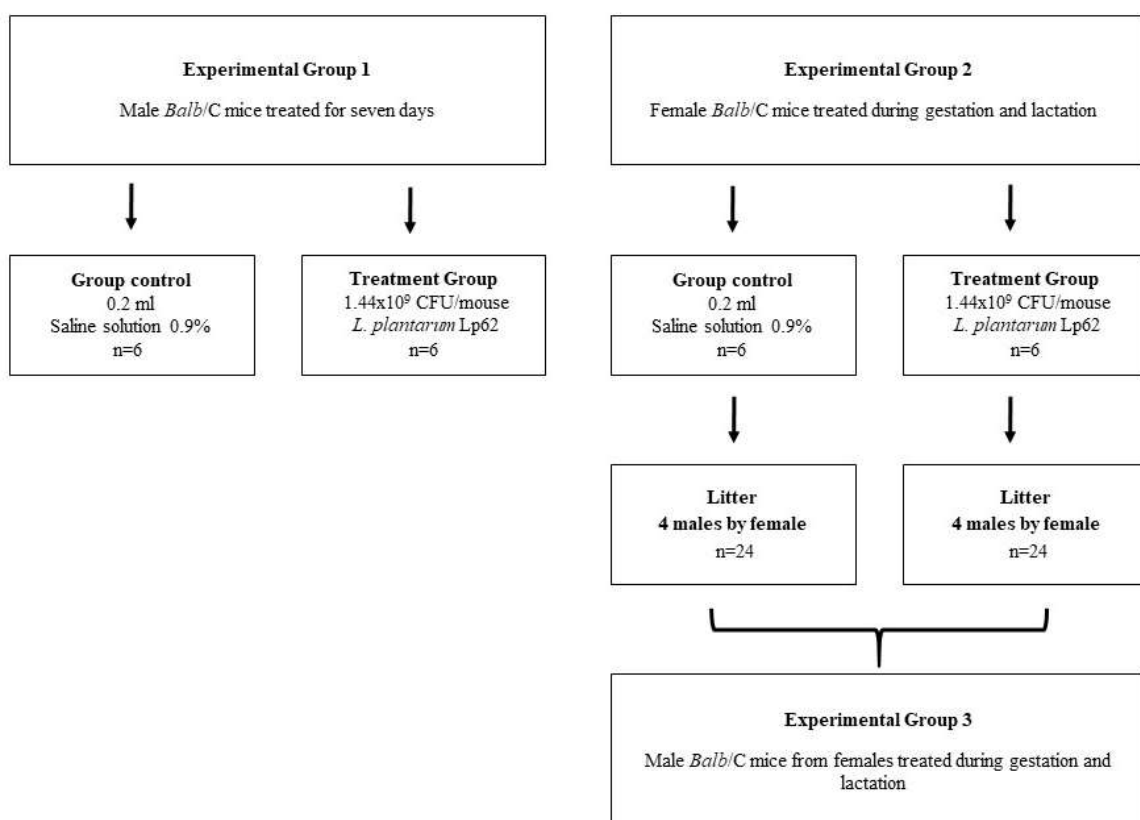


Fig. 1 Experimental groups.

Writhing test induced by acetic acid

The antinociceptive effect of *L. plantarum* Lp62 was evaluated by the writhing test induced by acetic acid according to the procedures previously described [21, 22]. The three experimental groups, treatment and control, received intraperitoneal (i.p.) injection of 0.6% acetic acid (0.1 mL/10g, Sigma, St. Louis, MO, USA). After the administration of the acetic acid, the number of writhes and stretching movements (contraction of the abdominal musculature and extension of the hind limbs) was counted at 5 min intervals for a period of 20 min.

Nociception induced by intraplantar injection of formalin

Formalin-induced hypernociception behavior was assessed as described previously [23]. The three experimental groups, treatment and control, received formalin solution at the concentration of 1% (formaldehyde – Sigma, St. Louis, MO, USA) intraplantar (20 μ L/paw) in the right hind paw. The mice

were observed for 30 min after the formalin injection, and pain behavior was determined by the number of flinches, biting and licking of the injected paw counted during the observation period time. The acute phase (phase 1) was defined as 0–15 min after injection, and the persistent tonic phase (phase 2) was defined as 15–30 min after injection. After the end of the experiment, both posterior paws were removed and weighted using an analytical balance. The weight of the paw which did not receive the formalin injection (left paw) was subtracted from the weight of the injected paw (right paw) in order to determinate the edema formation. The results were express in grams (g). As a positive control analgesics, a group of adult male *Balb/C* mice (n=8) was treated subcutaneously (s.c.) with morphine (5 mg/kg respecting 10 ml/kg; Cristalia, Itapira, SP, Brazil). As a positive anti-inflammatory control, a group of adult male *Balb/C* mice (n=8) were treated subcutaneously (s.c.) with indomethacin (30 mg/ kg; Merck Sharp & Dohme, São Paulo, SP, Brazil). After 30 minutes, they received the injection of 1% formalin solution, and for 30 minutes the nociception indicators were evaluated.

Evaluation of neutrophil migration

To evaluate the anti-inflammatory activity, the three experimental group's, treatment and control, were submitted to the neutrophil recruitment for the peritoneal cavity test, after the intraperitoneal administration of the carrageenan (Cg). The mice were sacrificed 4 h after Cg (500 µg/cavity) administration, and the peritoneal cavity cells were harvested by washing the cavity with 3 mL of phosphate-buffered saline (PBS) containing 1 mM EDTA. The recovered volume was similar in all experimental groups and equated to approximately 95% of the injected volume. Total counts were performed in a Neubauer chamber. Differential cell counts (100 cells in total) were performed on a cytocentrifuge (PRESVAC CT12, Curitiba, Brazil) using slides stained with Panoptic. The results are presented as the number of neutrophils per cavity [24]. The cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-10 were also determinate from the peritoneal lavage through the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to the manufacturer's protocol (R&D Systems®, Minneapolis, USA).

Evaluation of body weight variation of orally treated females during gestation and lactation with *L. plantarum* Lp62 and their untreated pups during the experiment

In order to evaluate changes in weight of the animals during the experiment, females treated during gestation and lactation with *L. plantarum* Lp62 and their respective untreated pups were weighed separately on analytical balance, 24 h after delivery and on the last day of breastfeeding (21st day). In the control group, the females were treated with saline solution (0.9%) during gestation and lactation. The weight change of the females and pups was calculated by the difference of the mean of the weight of 21st day with the mean of the weight of 24 hours after the delivery (2st day). It was also evaluated the weight of the pups 24 hours after their birth.

Evaluation of the toxicological effects of oral treatment of *L. plantarum* Lp62 in the experimental animal model

To evaluate the toxicological effects of oral treatment of *L. plantarum* Lp62, the following organs were removed and weighed: adrenals, spleen, heart, stomach, liver, ovaries plus uterus (females), pancreas, lungs, kidneys and thymus. A macroscopic assessment of the tissues was also performed to see if there was any visible intoxication injury. The organs were removed from the three experimental groups, both treatment and control group. The organs were weighed separately in analytical balance, the result was obtained in grams (g). Signal evaluation was also performed, where the observation of behavioral changes in the animals was based on the hippocratic screening. The factors evaluated were: general activity, motility, piloerection, exophthalmia, licking paws, hypnosis, snout reflex, tail biting, clonic/tonic convulsion, fine/coarse tremors, tail erection, tail tremor, sedation, catatonia, anesthesia, and ataxia. In relation to urination, it was observed if there was a change in the color of urine. Other possible effects that were observed were diarrhea, contortion, leakage reaction, aggression, squeak and death [25].

Statistical analysis

All variables were tested for normal distribution and homogeneous variance. For the data with two variables the Student's t-test or its non-parametric equivalent Mann-Whitney test was used. For the data with three or more variables, the Kruskal-Wallis test was used, followed by multiple comparisons by the Dunn's test. GraphPad Prism® version 5.00 (GraphPad®, La Jolla, CA92037, USA) was used for all analyzes. Values were considered significant when presented $p < 0.05$.

Results

Antinociceptive, anti-inflammatory and toxicological effects of oral treatment with *L. plantarum* Lp62 in the group of adult male mice treated for seven days

To evaluate the antinociceptive effect of the oral treatment with *L. plantarum* Lp62, it was tested in two different types of nociception: visceral nociception (acetic acid-induced abdominal constriction assay) and neurogenic and inflammatory nociception (formalin test). The results at Figure 2 indicate the inhibition of visceral nociception induced by acetic acid in the group treated with *L. plantarum* Lp62, with significant reduction of the number of writhing (40.15 ± 2.25), when compared to the control group (53.38 ± 3.74) ($p < 0.05$). In the nociceptive test induced by intraplantar formalin injection (Figure 3), *L. plantarum* Lp62 (34.83 ± 2.72) presented analgesic effect, with a statistically significant reduction in the number of flinches in phase 1 (0-5 minutes), when compared to the saline group (58.86 ± 1.98) ($p < 0.05$). The antinociceptive effect of morphine showed a significant reduction in the number of flinches (9.83 ± 2.08) when compared to the saline group ($p < 0.05$). The analgesic effect of *L. plantarum* Lp62 was statistically lower when compared to the morphine group in phase 1 ($p < 0.05$). In phase 2 (5-30 minutes) in Figure 3, *L. plantarum* Lp62 presented analgesic effect, a reduced number of flinches (37.67 ± 1.97) when compared to the saline group (65.80 ± 11.03) ($p < 0.05$). This antinociceptive effect was statistically lower when compared to morphine (1.33 ± 0.54), which also exerts antinociceptive action when compared to the saline group in this phase ($p < 0.05$). The results of the evaluation of paw edema after formalin injection are shown in Figure 4. *L. plantarum* Lp62 was not able to reduce the formation of edema (0.06 ± 0.004 g) when compared to the saline group (0.08 ± 0.004 g) ($p > 0.05$). Reduction of edema was observed in the indomethacin control group (0.02 ± 0.004 g) when compared to saline ($p < 0.05$). When compared to indomethacin, the antidematogenic effect of *L. plantarum* Lp62 was statistically lower ($p < 0.05$).

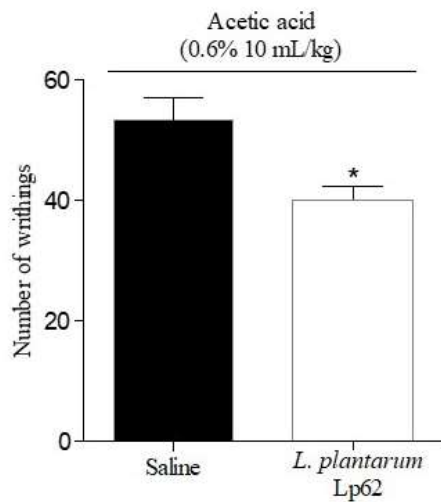


Fig.2 Effect of *L. plantarum* Lp62 on the acetic acid-induced abdominal writhing test in adult males mice treated for seven days. Control group: 0.2 mL of saline solution (0.9%). Treatment group: 1.44×10^9 CFU/mouse of *L. plantarum* Lp62. The results are presented as the mean \pm S.D. (n = 6) of the number of abdominal writhing in a period of 20 min. Statistical analysis was calculated by the Mann Whitney test. * $p < 0.05$ compared to the saline group.

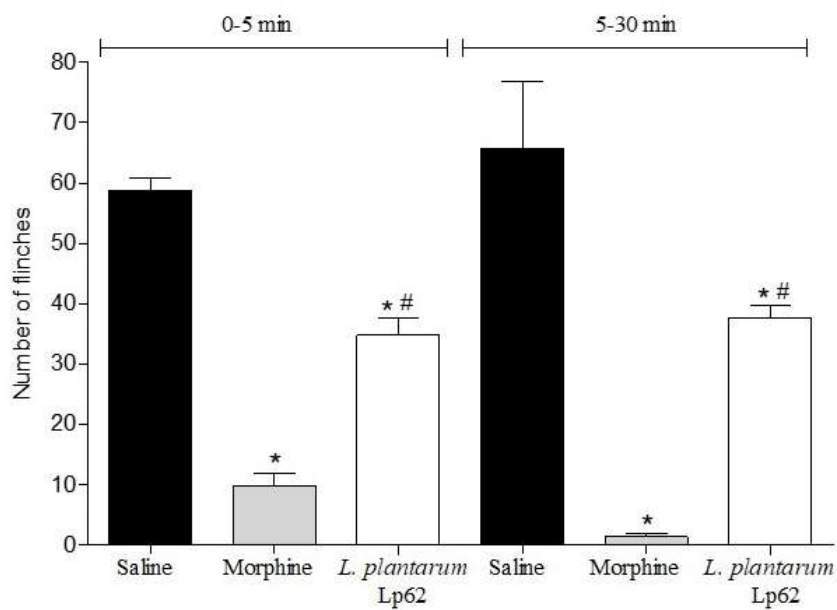


Fig. 3 Effect of *L. plantarum* Lp62 on the nociception response induced by intraplantar injection of formalin during the neurogenic phase (0-5) and inflammatory phase (5-30) in adult males mice treated for seven days. Positive control group: morphine (5 mg/kg, s.c.). Negative control group: 0.2 mL of saline solution (0.9%). Treatment group: 1.44×10^9 CFU/mouse of *L. plantarum* Lp62. The results are presented as the mean \pm S.D. (n = 6) of the number of flinches in the injected paw for a period of 30 min. Statistical analysis was calculated by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test. * $p < 0.05$ compared to the saline group. # $p < 0.05$ compared to the morphine group.

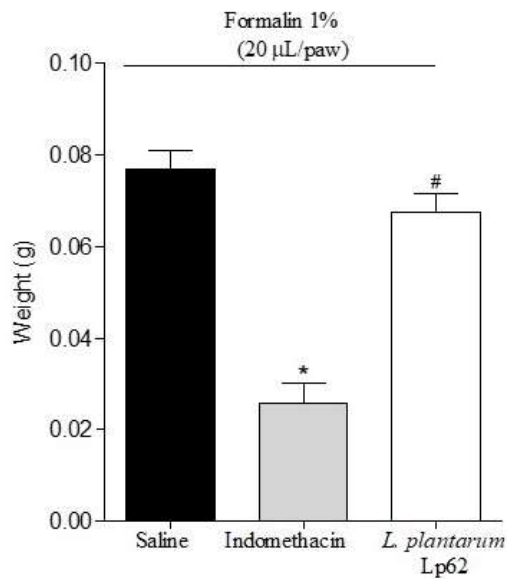


Fig. 4 Effect of *L. plantarum* Lp62 on the induction of paw edema with an intraplantar injection of formalin in adult male mice treated for seven days. Positive control group: indomethacin (30 mg/kg, s.c.). Negative control group: 0.2 mL of saline solution (0.9%). Treatment group: 1.44×10^9 CFU/mouse of *L. plantarum* Lp62. The results are presented as the mean \pm S.D. (n = 6). Statistical analysis was calculated by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test. * $p < 0.05$ compared to the saline group. # $p < 0.05$ compared to the morphine group.

To evaluate the anti-inflammatory effect of the oral treatment of *L. plantarum* Lp62, we first evaluated the migration of neutrophils induced by carrageenan (Cg) into the peritoneal cavity of mice (Figure 5). Pretreatment with *L. plantarum* Lp62 decreased neutrophil migration, induced by intraperitoneal Cg injection in the group of male animals treated for 7 days ($2,46 \pm 0.4$), when compared to the control group (3.80 ± 0.38) ($p < 0.05$). Furthermore, the results show that the concentration of IL-10, TNF- α and IL-1 β cytokines in the peritoneal fluid of mice were similar in the animals treated with *L. plantarum* Lp62 and the control group ($p < 0.05$) (Table 1).

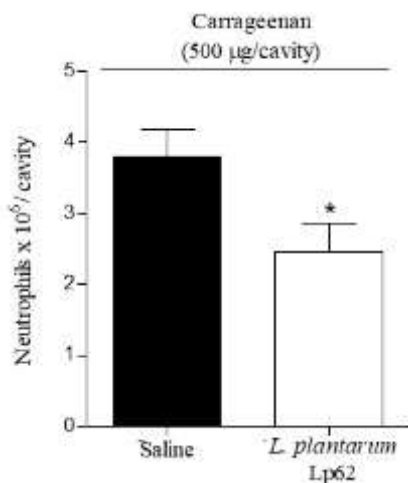


Fig. 5 Effect of *L. plantarum* Lp62 on the inhibition of neutrophil migration to the abdominal cavity in the group of adult male animals treated for seven days. Control group: 0.2 mL of saline solution (0.9%). Treatment group: 1.44×10^9 CFU/mouse of *L. plantarum* Lp62. Results are presented as mean \pm SD (n = 6). Statistical analysis was calculated by the Mann-Whitney test. * $p < 0.05$ compared to the saline group.

Table 1 Effect of pre-treatment of *L. plantarum* Lp62 on the concentration of IL-10, TNF- α and IL-1 β cytokines in the peritoneal fluid of adult male mice challenged with carrageenan

	Saline 0.9%	<i>L. plantarum</i> Lp62
IL-10	604.3 \pm 255.9	603.2 \pm 273.1
TNF- α	58.83 \pm 87.21	21.23 \pm 57.31
IL-1 β	804.7 \pm 19.65	685.6 \pm 95.31

The concentrations of the cytokines tested were determined by ELISA. Control group: 0.2 mL of saline solution (0.9%). Treatment group: 1.44x10⁹CFU/mouse of *L. plantarum* Lp62. The results are presented as the mean \pm S.D. (n = 6). Statistical analysis was calculated by Student's t test or the Mann Whitney test.

In the toxicological evaluation of the oral treatment with *L. plantarum* Lp62 no visible lesions, behavioral changes and death were observed in the group of animals treated for seven days. Statistical difference in the weight of organs between *L. plantarum* Lp62 treated group and saline group was also not observed ($p > 0.05$) (Table 2).

Table 2 Evaluation of the weight of organs of oral treatment with *L. plantarum* Lp62 in the group of adult male mice treated for seven days

	Saline 0.9%	<i>L. plantarum</i> Lp62
Adrenal	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01
Spleen	0.11 \pm 0.03	0.09 \pm 0.01
Heart	0.12 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01
Stomach	0.38 \pm 0.10	0.42 \pm 0.12
Liver	1.45 \pm 0.12	1.45 \pm 0.17
Pancreas	0.19 \pm 0.05	0.21 \pm 0.06
Lungs	0.22 \pm 0.07	0.18 \pm 0.02
Kidneys	0.42 \pm 0.06	0.39 \pm 0.04
Thymus	0.10 \pm 0.09	0.08 \pm 0.07

Control group: 0.2 mL of saline solution (0.9%). Treatment group: 1.44x10⁹CFU/mouse of *L. plantarum* Lp62. Results are presented as mean \pm SD (n = 6). Statistical analysis was calculated by Student's t test or the Mann Whitney test.

Antinociceptive, anti-inflammatory, toxicological effects and body weight variation of oral treatment with *L. plantarum* Lp62 in the group of female mice treated during gestation and lactation

At Figure 6, it shows the results of acetic acid-induced abdominal writhing test. Female mice treated with *L. plantarum* strain Lp62 presented analgesic activity observed by the decrease in the number of writhes (16.11 \pm 8.01) when compared to the saline group (47.67 \pm 5.57) ($p < 0.05$). In the nociception test induced by intraplantar formalin injection (Figure 7), it was also possible to observe the analgesic effect of the strain (31.25 \pm 0.72) by reducing the number of flinches in phase 1 (0-5 minutes) in relation to the saline group (52.25 \pm 3.51) ($p < 0.05$). In phase 2 (5-30 minutes), the group treated with *L. plantarum* Lp62 did not show analgesic action ($p > 0.05$) when compared to the saline treated group. In the edema of the paw (Figure 8), *L. plantarum* Lp62 (0.06 \pm 0.004 g) was able to reduce the formation of edema when compared to the saline group (0.10 \pm 0.006 g) ($p < 0.05$).

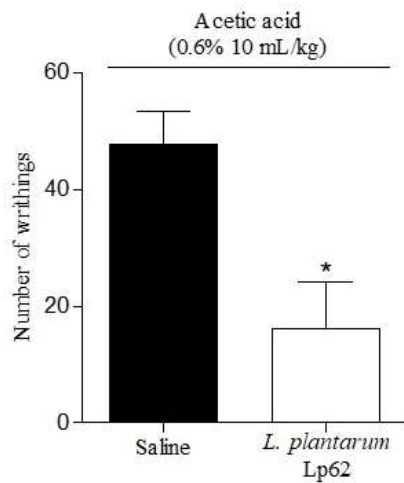


Fig. 6 Effect of *L. plantarum* Lp62 on the acetic acid-induced abdominal writhing test in female mice treated during gestation and lactation. Control group: 0.2 mL of saline solution (0.9%). Treatment group: 1.44×10^9 CFU/mouse of *L. plantarum* Lp62. The results are presented as the mean \pm S.D. (n = 6) of the number of abdominal writhing for a period of 20 min. Statistical analysis was calculated by the Mann Whitney test. * $p < 0.05$ compared to the saline group.

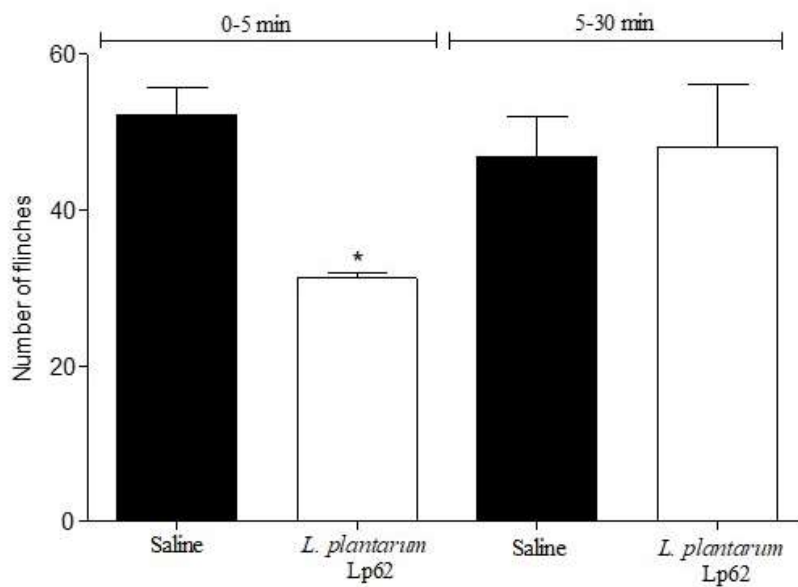


Fig. 7 Effect of *L. plantarum* Lp62 on the nociception response induced by intraplantar injection of formalin during the neurogenic phase (0-5) and inflammatory phase (5-30) in female mice treated during gestation and lactation. Control group: 0.2 mL of saline solution (0.9%). Treatment group: 1.44×10^9 CFU/mouse of *L. plantarum* Lp62. The results are presented as the mean \pm S.D. (n = 6) of the number of flinches in the injected paw for a period of 30 min. Statistical analysis was calculated by the Mann Whitney test. * $p < 0.05$ compared to the saline group.

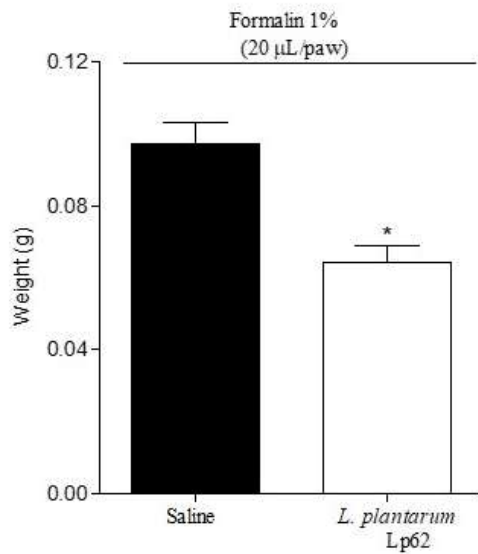


Fig. 8 Effect of *L. plantarum* Lp62 on the induction of paw edema with an intraplantar injection of formalin in female mice treated during gestation and lactation. Control group: 0.2 mL of saline solution (0.9%). Treatment group: 1.44×10^9 CFU/mouse of *L. plantarum* Lp62. The results are presented as the mean \pm S.D. (n = 6). Statistical analysis was calculated by the Mann Whitney test. * $p < 0.05$ compared to the saline group.

In the neutrophil recruitment test for peritoneal cavity (Figure 9), *L. plantarum* Lp62 showed no significant anti-inflammatory effect after carrageenan injection in the group of treated female mice during gestation and lactation compared to saline group ($p > 0.05$).

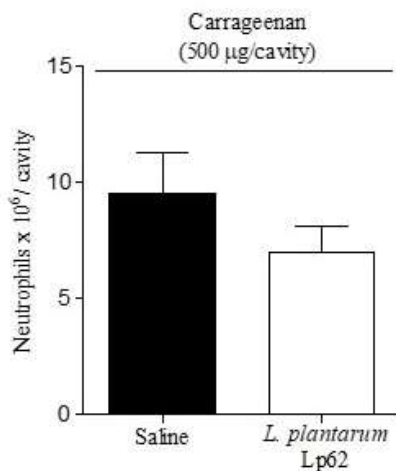


Fig. 9 Effect of *L. plantarum* Lp62 on the inhibition of neutrophil migration to the abdominal cavity in the group of female mice treated during gestation and lactation. Control group: 0.2 mL of saline solution (0.9%). Treatment group: 1.44×10^9 CFU/mouse of *L. plantarum* Lp62. Results are presented as mean \pm SD (n = 6). Statistical analysis was calculated by the Mann Whitney test.

The body weight of the female mice were determined in the end of the experiment (Figure 10). Oral treatment with *L. plantarum* Lp62 reduced the body weight of the females (-0.70 ± 0.69) at the end of breastfeeding compared to the saline group (3.11 ± 0.64) ($p < 0.05$).

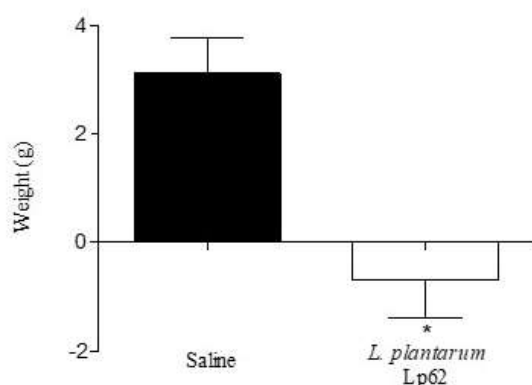


Fig. 10 Effect of *L. plantarum* Lp62 on weight gain of treated female mice during gestation and lactation. Control group: 0.2 mL of saline solution (0.9%). Treatment group: 1.44×10^9 CFU/mouse of *L. plantarum* Lp62. Results are presented as mean \pm SD (n = 6). Statistical analysis was calculated by the Mann Whitney test. * $p < 0.05$ compared to the saline group.

It was not possible to observe macro lesions, signs of hippocatic screening and death in the group of female animals treated during gestation and lactation with *L. plantarum* Lp62. However, a significant reduction in the weight of the kidneys, and ovary plus uterus (Table 3) was observed in relation to the control group ($p < 0.05$).

Table 3 Evaluation of the weight of organs with oral treatment with *L. plantarum* Lp62 in the group of female mice treated during gestation and lactation

	Saline 0.9%	<i>L. plantarum</i> Lp62
Adrenal	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.01
Spleen	0.11 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01
Heart	0.15 \pm 0.02	0.15 \pm 0.02
Stomach	0.73 \pm 0.29	0.59 \pm 0.18
Liver	1.75 \pm 0.25	1.60 \pm 0.30
Pancreas	0.26 \pm 0.12	0.23 \pm 0.08
Lungs	0.22 \pm 0.04	0.24 \pm 0.05
Kidneys	0.42 \pm 0.05	0.37 \pm 0.05 ^a
Thymus	0.03 \pm 0.02	0.04 \pm 0.02
Ovary + uterus	0.30 \pm 0.13	0.17 \pm 0.05 ^a

Control group: 0.2 mL of saline solution (0.9%). Treatment group: 1.44×10^9 CFU/mouse of *L. plantarum* Lp62. Results are presented as mean \pm SD (n = 6). Statistical analysis was calculated by Student's t test or the Mann Whitney test. ^a $p < 0.05$ compared to the saline group.

Antinociceptive, anti-inflammatory, toxicological effects and body weight variation of oral treatment with *L. plantarum* Lp62 in the group of adult male mice from the litter of females treated during gestation and lactation

The treatment with *L. plantarum* Lp62 showed a significant reduction in the number of writhing episodes (33.77 ± 5.77) induced by acetic acid administration (Figure 11) when compared to the saline group (59.87 ± 3.32) ($p < 0.05$). However, the *L. plantarum* Lp62 were not effective in reducing nociception in the neurogenic phase (0-5 minutes) and in the inflammatory phase (5-30 minutes) when compared to the saline group ($p > 0.05$) (Figure 12). The treatment with Lp62 also was not able to reduce the formation of edema when compared to the saline group ($p > 0.05$) (Figure 13).

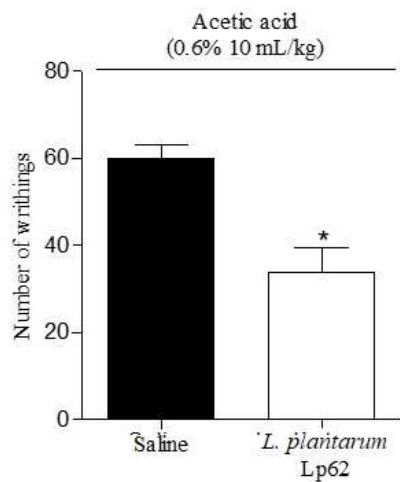


Fig.11 Effect of *L. plantarum* Lp62 on the acetic acid-induced abdominal writhing test in adult male mice from the litter of females treated during gestation and lactation. Control group: 0.2 mL of saline solution (0.9%). Treatment group: 1.44×10^9 CFU/mouse of *L. plantarum* Lp62. The results are presented as the mean \pm S.D. (n = 24) of the number of abdominal writhing for a period of 20 min. Statistical analysis was calculated by the Mann Whitney test. * $p < 0.05$ compared to the saline group.

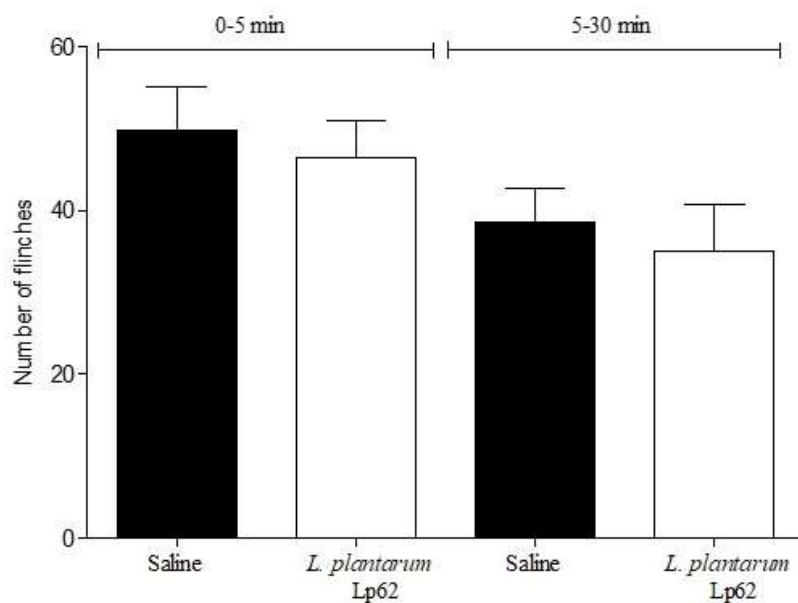


Fig. 12 Effect of *L. plantarum* Lp62 on the response to nociception induced by intraplantar injection of formalin during the neurogenic phase (0-5) and inflammatory phase (5-30) in adult male mice from the litter of females treated during gestation and lactation. Control group: 0.2 mL of saline solution (0.9%). Treatment group: 1.44×10^9 CFU/mouse of *L. plantarum* Lp62. The results are presented as the mean \pm S.D. (n = 24) of the number of flinches in the injected paw for a period of 30 min. Statistical analysis was calculated by the Mann Whitney test and Student's t test, respectively.

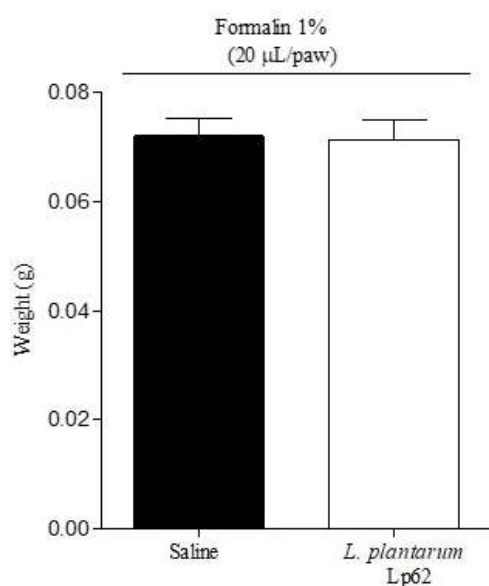


Fig. 13 Effect of *L. plantarum* Lp62 on the induction of paw edema with an intraplantar injection of formalin in adult male mice from the litter of females treated during gestation and lactation. Control group: 0.2 mL of saline solution (0.9%). Treatment group: 1.44×10^9 CFU/mouse of *L. plantarum* Lp62. The results are presented as the mean \pm S.D. (n = 24). Statistical analysis was calculated by the Student's t test.

Pretreatment with *L. plantarum* Lp62 did not reduce the neutrophil migration induced by intraperitoneal Cg injection (Figure 14) in the group of adult male animals from the litter of females treated during gestation and lactation compared to the control group ($p > 0.05$).

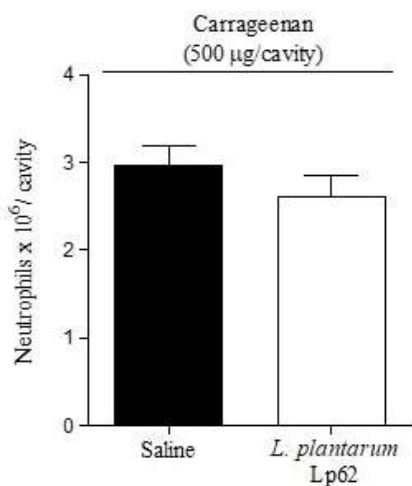


Fig. 14 Effect of *L. plantarum* Lp62 on the inhibition of neutrophil migration to the abdominal cavity in adult male mice from the litter of females treated during gestation and lactation. Control group: 0.2 mL of saline solution (0.9%). Treatment group: 1.44×10^9 CFU/mouse of *L. plantarum* Lp62. Results are presented as mean \pm SD (n = 24). Statistical analysis was calculated by the Mann Whitney test.

In relation to the body weight after 24 h of birth of males from the litter of treated females during gestation and lactation (Figure 15a), it was not observed statistically difference to the saline group ($p > 0.05$). However, the group of animals treated with *L. plantarum* Lp62 showed a statistical reduction in weight at the end of the lactation period – 21st day (8.69 ± 0.13), when compared to the control group (9.34 ± 0.15) ($p < 0.05$) (Figure 15b).

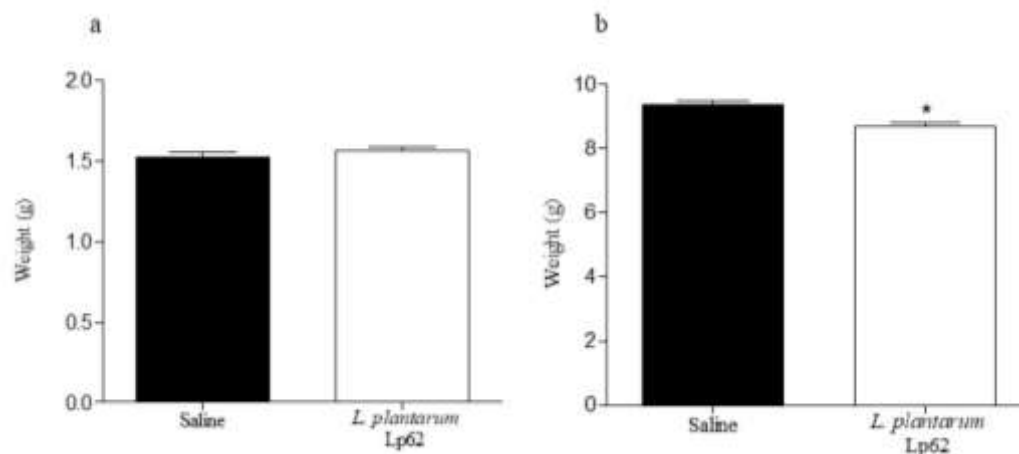


Fig. 15 Effect of *L. plantarum* Lp62 on the weight gain of male mice from the litter of treated females during gestation and lactation 24 h after birth (a) and on the 21st day (day of weaning) (b). Control group: 0.2 mL of saline solution (0.9%). Treatment group: 1.44×10^9 CFU/mouse of *L. plantarum* Lp62. Results are presented as mean \pm SD (n = 24). Statistical analysis was calculated by the Mann Whitney test and Student's t test, respectively. * $p < 0.05$ compared to the saline group.

In the group of animals from the litter of females treated during gestation and lactation, it was not observed macrolesions, behavioral changes and death. However, the weight of the kidneys (Table 4) treated with *L. plantarum* Lp62 was reduced compared to the control group ($p < 0.05$).

Table 4 Evaluation of the weight of organs with oral treatment *L. plantarum* Lp62 in the group of adult male mice from the litter of females treated during gestation and lactation

	Saline 0.9%	<i>L. plantarum</i> Lp62
Adrenal	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01
Spleen	0.10 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01
Heart	0.15 \pm 0.02	0.13 \pm 0.02
Stomach	0.33 \pm 0.04	0.34 \pm 0.07
Liver	1.30 \pm 0.20	1.22 \pm 0.15
Pancreas	0.19 \pm 0.08	0.31 \pm 0.12
Lungs	0.22 \pm 0.07	0.20 \pm 0.03
Kidneys	0.41 \pm 0.05	0.36 \pm 0.05 ^a
Thymus	0.5 \pm 0.02	0.07 \pm 0.02

Control group: 0.2 mL of saline solution (0.9%). Treatment group: 1.44×10^9 CFU/mouse of *L. plantarum* Lp62. Results are presented as mean \pm SD (n = 24). Statistical analysis was calculated by Student's t test or the Mann Whitney test. ^a $p < 0.05$ compared to the saline group.

Discussion

In this study, the antinociceptive properties of the *L. plantarum* Lp62 microorganism were observed through the abdominal contortion test induced by acetic acid, and nociception induced by intraplantar injection of formalin. Intraperitoneal injection of diluted solutions of acetic acid is a well established animal model for tonic visceral pain in rodents [26]. It is a general non-selective model for antinociceptive studies, because acetic acid indirectly induces the release of endogenous mediators, stimulating the peripheral nociceptor and sensory neurons that were sensitive to inflammatory mediators. Acetic acid causes local irritation and releases mediators such as bradykinin, substance P and prostaglandins, mainly PGI₂, as well as some cytokines such as IL-1 β , TNF- α and IL-8. These mediators activate chemosensitive nociceptors that contribute to the development of inflammatory pain, which in turn is sensitive to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), such as aspirin, diclofenac and indomethacin [22, 27–31].

In the group of animals treated for seven days, our results revealed that *L. plantarum* Lp62 reduced the abdominal contortions induced by acetic acid showing antinociceptive effect. Amdekar and Singh [32] evaluating the pharmacological activity of *L. rhamnosus* in the acetic acid-induced writhing

test also demonstrated the analgesic effect of this microorganism, suggesting as a mechanism of action a probable inhibition in the synthesis of prostaglandins (PGs), because it is known that abdominal constriction is related to sensitization of nociceptive receptors for these eicosanoids [33].

The formalin test is a satisfactory model to evaluate antinociceptive/anti-inflammatory activity [34]. Intraplantar injection of formalin is associated with two distinct phases. The first phase (0 to 5 minutes) is related to the direct activation of nociceptors in the afferent fibers C and A δ and to the release of excitatory amino acids, as nitric oxide and substance P (neurogenic pain), and the second phase (15-30) is associated to the release of inflammatory mediators, including prostaglandins, histamine, bradykinin, and serotonin (inflammatory pain). Opioid analgesics, such as morphine, inhibit nociception caused by formalin in both phases; however, peripheral drugs, such as indomethacin, inhibit only the second phase [23, 35–37].

L. plantarum Lp62 reduced the nociceptive behavioral response in the two phases of the formalin test in the group of treated animals for seven days, but was not effective in reducing paw edema. Possible mechanisms of action of Lp62 may involve opioid receptors or modulation of the signaling neurotransmitters such as γ -Aminobutyric acid (GABA) and serotonin, both involved in pain modulation [38]. *L. acidophilus* NCFM induced the expression of μ -opioid receptors in intestinal epithelial cells exerting analgesic effects in both animals and humans [39, 40]. Davis et al [41] demonstrated that the treatment with *L. plantarum* reduced anxiety-related behavior and altered GABAergic signaling, and especially serotonergic signaling in the brain. The ingestion of *L. rhamnosus* (JB-1) regulated the emotional behavior and central expression of the GABA receptor through the vagus nerve [42]. These studies demonstrate direct bi-directional biochemical signaling between the GI and the central nervous system, referred to as the "gut-brain- axis" [41–43].

The anti-inflammatory activity of Lp62 was also observed through the neutrophil recruitment test into the peritoneal cavity. Carrageenan causes an inflammatory response characterized by neutrophil infiltration, plasma exudation and production of mediators such as nitric oxide, PGE₂, IL-1 β , IL-6 and TNF- α [44, 45]. Treatment with *L. plantarum* Lp62 reduced the infiltration of neutrophils in the peritoneal cavity. Similar data were found by Dos Santos et al. [17], who studied the effect of pool of *L. fermentum* and *L. plantarum* strains, including Lp62, obtained from cocoa fermentation in a of experimental colitis model, and observed a reduction in the total number of blood leukocytes, mainly neutrophils and monocytes. However, in the present study, the concentration of IL-1 β , TNF- α and IL-10 did not change when compared to the control group. Another study realized with Lp62, which was performed *in vitro*, demonstrated a reduction in secretion of IL-1 β and TNF- α cytokines, and no changes in IL-10 levels secreted by macrophage. However Lp62 displayed the ability to increase IL-10 production in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [16].

In the group of females treated during gestation and lactation, it was not observed influence in the migration of neutrophils. However, the analgesic effect of Lp62 in the group of females treated during gestation and lactation was demonstrated by reducing the abdominal contortions induced by acetic acid and reducing the neurogenic pain and the paw edema in the formalin test. Lp62 did not show antinociceptive activity in the inflammatory phase of the formalin test. These data suggest a possible antinociceptive activity of Lp62 by reducing the direct stimulation of nociceptive fibers. The formation of paw edema by formalin is dependent on the stimulation of nociceptive afferent neurons through the release of substance P and the peptide related to the calcitonin gene (neurogenic inflammation) [46]. Hong and Abbott [47] demonstrated that plasma extravasation in rat paws evoked by formalin (1%) was reduced by a μ -opioid receptor agonist that inhibits the release of substance P from the primary afferent neurons. At the beginning of breastfeeding, most women experience mild pain or discomfort, because the nipple can become very sore and bruised. Nipple traumas include erythema, edema, fissures and ecchymosis, and are the most common causes of pain in breastfeeding [48]. Pathological engorgement also causes pain to the mother during lactation by excessive breast increase, and the pain is accompanied by fever and malaise. Mammary glands may become very hard and painful. The baby encounters serious nursing difficulties and in most cases refuses the breast. Milk often does not flow easily, preventing proper emptying of the breast, which worsens engorgement and pain. Pain is an important cause of early weaning, so intervention with probiotics may be a viable alternative to treatment [48, 49]. A lactation is a phenomenon strongly influenced by their emotions, and stress, nervousness and anxiety interfere in

the amount of milk produced or even can block milk production. [50]. Thus, the antinociception produced by Lp62 could help the lactating females to have a better lactation.

The intestinal microbiota exerts an important effect on the regulation of the energetic metabolism of the body, and dysbiosis plays a role in the development of obesity and it is associated with low grade inflammation. Therefore, consumption of probiotics may help to maintain homeostasis [51]. When the body weight of the females was evaluated at the end of lactation, it was possible to observe weight reduction in the group treated with Lp62. During the suckling period in the lactation, dam rats lose weight because their limited intake capacity cannot meet the nutritional requirements needed for milk production after parturition [52]. A study realized by Ilmonen et al. [53] with pregnant women treated until the end of exclusive breastfeeding for up to six months, combining diet with strains of probiotic microorganisms, showed reduction of central abdominal adiposity, a key predisposing factor for metabolic disorders including diabetes and cardiovascular diseases, in women during the postpartum period. *L. plantarum* was associated with significant weight loss effect in overweight/obese animals (rats and mice), but it was not significant the weight loss effect direction in normal weight animals [54]. Milk fermented by *L. gasseri* SBT2055 also decreased visceral adipose tissue mass and adipocyte hypertrophy by reducing the absorption of fatty acids [55, 56].

In the group of adult male mice from the litter of females treated with Lp62 during gestation and lactation, *L. plantarum* Lp62 demonstrated a significant reduction of abdominal pain in the acetic acid-induced nociception test. However, Lp62 did not present antinociceptive or antiedematogenic effects on pain of neurogenic and anti-inflammatory phases in the formalin test. Furthermore, Lp62 did not showed reduction of the number of neutrophils recruited into the peritoneal cavity induced by carrageenan. Somehow, our results demonstrate that administration to the pregnant and lactating females confers benefits to the litter not treated in the adulthood, probably by intestinal colonization of the litter during gestation or during breastfeeding. An increasing number of studies show a variety of positive effects of consumption of probiotics during pregnancy and breastfeeding on the mother and the newborn [57]. Schultz et al [58] showed that the temporary colonization of children with *L. rhamnosus* (L. GG) may be possible by colonizing the pregnant mother before delivery, and that this colonization is stable for as long as 6 months and may persist for as long as 24 months. It is known that the infant intestinal microbiota reaches a state similar to that of adults at 2-3 years of age, consistent with the establishment of a varied diet of solid foods [59] and that contact with microorganisms influences the development and maturation of the immune system [60]. Furthermore, recent findings suggest that bacteria selected from the maternal gastrointestinal microbiota can access the mammary glands, via an entero-mammary route. [61]. The translocation mechanism would involve dendritic cells and CD18⁺ cells [62, 63], which would be able to capture non-pathogenic bacteria from the intestinal lumen and subsequently take them to other tissues. It is also noted that there is a significant efflux of intestinal immune cells to the mammary glands during the end of pregnancy and lactation and that, in fact, the existence of an entero-mammary circulation of IgA-producing cells is already known [62]. Treven et al. [57] showed the effects of oral administration of probiotics *L. gasseri* K7 (LK7) and *L. rhamnosus* GG (LGG) during pregnancy and lactation on microbiota of the mouse mesenteric lymph nodes (MLN), mammary gland (MG), and milk. Live lactic acid bacteria but no LGG or LK7 were detected in blood, MLN, and MG. Although, both probiotics significantly increased the total bacterial load at MLN and MG, and increased the abundance of *Firmicutes* and lactic acid bacteria in MG, and *Lactobacillus* genus appeared exclusively in treated probiotic groups. The authors conclude that probiotics can modulate the bacterial composition of MLN and MG microbiota in ways that could improve the health of the MG and, ultimately, the health of the newborn.

Our results also demonstrate a small reduction of body weight of the litter of females treated with *L. plantarum* Lp62 at the end of the breastfeeding period. However, Lp62 induced higher levels of triglycerides, cholesterol and total proteins in the milk of rats also treated during gestation and lactation, possibly explaining by the increase in litter weight [18]. The administration of probiotic strains for pregnant and lactating women also provides the beneficial growth of babies [64, 65]. Regardless of the weight status of the birth of an individual, accelerated postnatal growth may contribute to increased adiposity and subsequent obesity risk [66, 67]. The possible reduced litter weight of Lp62 group could be explain by the *L. plantarum* antiobesity effects [68–70] or the difference of physiology between rats and mice.

The toxicological effect of *L. plantarum* Lp62 was evaluated by the weight of organs and signs based on the hippocratic screening. In the three experimental groups, there were no visible lesions, behavioral changes or death. However, reductions in the weight of the kidneys, ovaries and uterus were observed in the group of females treated during gestation and lactation. In untreated male mice from these females, the weight of the kidneys also decreased when compared to the control. Park et al. [69] demonstrated that treatment of animals with *L. plantarum* for 8 weeks did not change the weight of the kidneys, liver and spleen. Endres et al. [71] performed one-year chronic oral toxicity with combined reproduction toxicity study with the probiotic *Bacillus coagulans*, in an animal model (males and females), and demonstrated that after the treatment period, the weight of organs evaluated (liver, brain, heart, thymus, spleen, kidneys, testis, epididymis, uterus, thyroid/parathyroid glands, adrenal glands and ovaries) showed no treatment-related effects. Even when the body weights of the treated animals showed slightly reduction or increase compared to the control, the authors emphasized that the values were within historical control intervals and did not correlate with histopathology. The histopathological examination of the ovaries and uterus of females treated during the period of reproduction also presented normal structural characteristics. In addition, clinical observation and pathological examination revealed no treatment-related effects on the offspring. Therefore, it is necessary to perform histopathological examinations to verify if the changes observed in the kidneys and ovary and uterus of the present study are in fact related to the effects of Lp62.

Conclusion

The oral treatment with *L. plantarum* Lp62 showed antinociceptive effects mainly on the neurogenic phase in females and adult's male group and reduction of edema originating from neurogenic nociception. The effects of *L. plantarum* Lp62 were lower in the adults male mice untreated from the litter of females treated. Thus, the present study provided evidence that the *L. plantarum* Lp62 has anti-inflammatory and antinociceptive activities when administered by orally to the mice, and more studies should be conducted to better to elucidate their mechanism of action and toxicology.

Acknowledgments

Research was supported by grants and scholarships of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the State of Bahia Research Foundation (FAPESB – REDE 11/2014) and Coordination for the Enhancement of Higher Education Personnel (CAPES), Tutorial Educational Program (MEC/SESU).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest

There are no actual or potential conflicts of interest that might influence judgment on the part of any author.

References

1. Milani C, Ferrario C, Turrone F, et al (2016) The human gut microbiota and its interactive connections to diet. *J Hum Nutr Diet* 29:539–546. doi: 10.1111/jhn.12371
2. Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT, Vos WM (2011) Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes Nutr* 6:209–240. doi: 10.1007/s12263-011-0229-7
3. Kristensen NB, Bryrup T, Allin KH, et al (2016) Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials. *Genome Med* 8:1–11. doi: 10.1186/s13073-016-0300-5
4. Lane ER, Zisman TL, Suskind DL (2017) The microbiota in inflammatory bowel disease:

- Current and therapeutic insights. *J Inflamm Res* 10:63–73. doi: 10.2147/JIR.S116088
5. Fao/OMS (2001) Probiotics in food. *Food Nutr Pap* 85:71. doi: 10.1201/9781420009613.ch16
 6. Saad SMI (2006) Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Rev Bras Cienc Farm* 42:1–16. doi: 10.1590/S1516-93322006000100002
 7. Rijkers GT, Bengmark S, Enck P, et al (2010) Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: current status and recommendations for future research. *J Nutr* 140:671S–676S. doi: 10.3945/jn.109.113779
 8. Bond DM, Morris JM, Nassar N (2017) Study protocol : evaluation of the probiotic *Lactobacillus Fermentum* CECT5716 for the prevention of mastitis in breastfeeding women : a randomised controlled trial. *BMC Pregnancy Childbirth* 17:1–8. doi: 10.1186/s12884-017-1330-8
 9. Victora CG, Bahl R, Barros AJD, et al (2016) Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet* 387:475–490. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01024-7
 10. Sanz Y (2011) Gut microbiota and probiotics in maternal and infant health. *Am J Clin Nutr* 94:2000S–2005S. doi: 10.3945/ajcn.110.001172.2000S
 11. Bengmark S (1998) Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* 42:2–7. doi: 10.1136/gut.42.1.2
 12. Bixquert Jimenez M (2009) Treatment of irritable bowel syndrome with probiotics. An etiopathogenic approach at last? *Rev Esp Enferm Dig* 101:553–564. doi: 10.4321/S1130-01082009000800006
 13. Siezen RJ, van Hylckama Vlieg JET (2011) Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. *Microb Cell Fact* 10:1–13. doi: 10.1186/1475-2859-10-S1-S3
 14. Pathmakanthan S, Li CKF, Cowie J, Hawkey CJ (2004) *Lactobacillus plantarum* 299: beneficial in vitro immunomodulation in cells extracted from inflamed human colon. *J Gastroenterol Hepatol* 19:166–173.
 15. Nobaek S, Johansson ML, Molin G, et al (2000) Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 95:1231–1238. doi: 10.1111/j.1572-0241.2000.02015.x
 16. Santos TF dos, Melo TA, Almeida ME, et al (2016) Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* Lp62 on intestinal epithelial and mononuclear cells. *Biomed Res Int* 2016:1–8. doi: 10.1155/2016/8404156
 17. Dos Santos TF, Melo TA, Santos DS, et al (2016) Efficacy of oral administration of lactic acid bacteria isolated from cocoa in a fermented milk preparation: reduction of colitis in an experimental rat model. *Genet Mol Res* 15:1–13. doi: 10.4238/gmr.15038097
 18. Messias GC (2017) Avaliação da atividade galactagoga do microrganismo probiótico *Lactobacillus plantarum* isolado da fermentação de amêndoas de cacau. Dissertação, Universidade Federal da Bahia
 19. Agostoni C, Axelsson I, Braegger C, et al (2004) Prebiotic oligosaccharides in dietetic products for infants: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 39:465–473. doi: 10.1097/00005176-200411000-00003
 20. Verna EC, Lucak S (2010) Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? *Ther Adv Gastroenterol* 3:307–319. doi: 10.1177/1756283X10373814
 21. Vacher PJ, Marullaz DP, Barbot P (1964) A propos de quelques produits usuels. *Comparaison*

- de deux méthodes d'étude des analgésiques. *Med Exp* 11:51–58. doi: <https://doi.org/10.1159/000135457>
22. Koster R, Anderson M, Boer E de (1959) Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc* 18:412–416.
 23. Tjølsen A, Berge O-G, Hunskaar S, et al (1992) The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51:5–17. doi: 10.1016/0304-3959(92)90003-T
 24. Nunes BS, Rensonnet NS, Dal-Secco D, et al (2009) Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379:609–616. doi: 10.1007/s00210-009-0397-9
 25. Costa TN (2013) Avaliação da toxicidade aguda e subcrônica do *Aspidosperma subincanum* (Apocynaceae) em camudongos. Universidade Federal de Goiás, Goiânia
 26. Martínez V, Coutinho S V., Thakur S, et al (1999) Differential effects of chemical and mechanical colonic irritation on behavioral pain response to intraperitoneal acetic acid in mice. *Pain* 81:179–186. doi: 10.1016/S0304-3959(99)00008-1
 27. Ikeda Y, Ueno A, Naraba H, Oh-ishi S (2001) Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanooids in the acid-induced writhing responses of mice. *J Life Sci* 69:2911–2919.
 28. Ribeiro RA, Vale ML, Thomazzi SM, et al (2000) Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharmacol* 387:111–118. doi: 10.1016/S0014-2999(99)00790-6
 29. Pinheiro BG, Silva ASB, Souza GEP, et al (2011) Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. *J Ethnopharmacol* 138:479–486. doi: 10.1016/j.jep.2011.09.037
 30. Couto VM, Vilela FC, Dias DF, et al (2011) Antinociceptive effect of extract of *Emilia sonchifolia* in mice. *J Ethnopharmacol* 134:348–353. doi: 10.1016/j.jep.2010.12.028
 31. Deraedt R, Jouquey S, Delevalle F, Flahaut M (1980) Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. *Eur J Pharmacol* 61:17–24. doi: 10.1016/0014-2999(80)90377-5
 32. Amdekar S, Singh V (2016) Studies on anti-inflammatory and analgesic properties of *Lactobacillus rhamnosus* in experimental animal models. *J Complement Integr Med* 13:145–150. doi: 10.1515/jcim-2015-0087
 33. Nwidu LL, Airhihen B, Ahmadu A (2017) Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of stem-bark extracts and fractions of *Carpolobia lutea* (Polygalaceae). *J Basic Clin Pharm* 8:25–32. doi: 10.4103/0976-0105.195097
 34. Verdam MCDS, Guilhon-Simplicio F, Andrade KC De, et al (2017) Analgesic, anti-inflammatory, and antioxidant activities of *Byrsonima duckeana* W. R. Anderson (Malpighiaceae). *Sci World J* 2017:1–8. doi: 10.1155/2017/8367042
 35. Monteiro É, Chibli L, Yamamoto C, et al (2014) Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the Sesame oil and Sesamin. *Nutrients* 6:1931–1944. doi: 10.3390/nu6051931
 36. Hunskaar S, Hole K (1987) The formalin test in mice : dissociation between. *Pain* 30:103–114.
 37. Silva JC, Raquel S, Lima G De, et al (2013) Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais : uma revisão. *Rev Bras Farm* 94:18–23.
 38. Benson C, Mifflin K, Kerr B, et al (2015) Biogenic amines and the amino acids GABA and glutamate: Relationships with pain and depression. *Mod Trends Pharmacopsychiatry* 30:67–79. doi: 10.1159/000435933

39. Rousseaux C, Thuru X, Gelot A, et al (2007) *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nat Med* 13:35–37. doi: 10.1038/nm1521
40. Ringel-Kulka T, Goldsmith JR, Carroll IM, et al (2014) Randomized clinical trial: *Lactobacillus acidophilus* NCFM affects colonic mucosal opioid receptors expression in human patients with functional abdominal pain. *Aliment Pharmacol Ther* 40:200–207. doi: 10.1111/apt.12800
41. Davis DJ, Doerr HM, Grzelak AK, et al (2016) *Lactobacillus plantarum* attenuates anxiety-related behavior and protects against stress-induced dysbiosis in adult zebrafish. *Sci Rep* 6:1–11. doi: 10.1038/srep33726
42. Bravo JA, Forsythe P, Chew M V, et al (2011) Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:16050–16055. doi: 10.1073/pnas.1102999108
43. Dai Y-J, Wang H-Y, Wang X-J, et al (2017) Potential beneficial effects of probiotics on human migraine headache: a literature review. *Pain Physician* 20:E251–E255.
44. Salvemini D, Wang ZQ, Wyatt PS, et al (1996) Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br J Pharmacol* 118:829–838. doi: 10.1111/j.1476-5381.1996.tb15475.x
45. Loram LC, Fuller A, Fick LG, et al (2007) Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. *J Pain* 8:127–136. doi: 10.1016/j.jpain.2006.06.010
46. Damas J, Liégeois JF (1999) The inflammatory reaction induced by formalin in the rat paw. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359:220–227. doi: 10.1007/PL00005345
47. Hong Y, Abbott F V. (1995) Peripheral opioid modulation of pain and inflammation in the formalin test. *Eur J Pharmacol* 277:21–28. doi: 10.1016/0014-2999(95)00045-M
48. Giugliani ERJ (2004) Problemas comuns na lactação e seu manejo. *J Pediatr* 80:147–154. doi: 10.1590/S0365-05962010000200024
49. Alekseev NP, Vladimir II, Nadezhda TE (2015) Pathological postpartum breast engorgement: prediction, prevention, and resolution. *Breastfeed Med* 10:203–208. doi: 10.1089/bfm.2014.0047
50. Arantes CIS (1995) Amamentação - visão das mulheres que amamentam. *J Pediatr* 71:195–202. doi: 10.2223/JPED.777
51. Morales P, Brignardello J, Gotteland M (2010) La microbiota intestinal: Un nuevo actor en el desarrollo de la obesidad. *Rev Med Chile* 138:1020–1027. doi: 10.4067/S0034-98872010000800013
52. Williamson DH (1980) Integration of metabolism in tissues of the lactating rat. *FEBS lett* 117:K93-105. doi: 10.1016/0014-5793(80)80574-6
53. Ilmonen J, Isolauri E, Poussa T, Laitinen K (2011) Impact of dietary counselling and probiotic intervention on maternal anthropometric measurements during and after pregnancy : A randomized placebo-controlled trial. *Clin Nutr* 30:156–164. doi: 10.1016/j.clnu.2010.09.009
54. Million M, Angelakis E, Paul M, et al (2012) Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. *Microb Pathog* 53:100–108. doi: 10.1016/j.micpath.2012.05.007
55. Hamad EM, Sato M, Uzu K, et al (2009) Milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 influences adipocyte size via inhibition of dietary fat absorption in Zucker rats. *Br J Nutr*

101:716–724. doi: 10.1017/S0007114508043808

56. Sato M, Uzu K, Yoshida T, et al (2008) Effects of milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 on adipocyte size in rats. *Br J Nutr* 99:1013–1017. doi: 10.1017/S0007114507839006
57. Treven P, Mrak V, Matijašić BB, et al (2015) Administration of probiotics *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus gasseri* K7 during pregnancy and lactation changes mouse mesenteric lymph nodes and mammary gland microbiota. *J Dairy Sci* 98:2114–2128. doi: 10.3168/jds.2014-8519
58. Schultz M, Göttl C, Young RJ, et al (2004) Administration of oral probiotic bacteria to pregnant women causes temporary infantile colonization. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 38:293–297. doi: 10.1097/00005176-200403000-00012
59. Voreades N, Kozil A, Weir TL (2014) Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Front Microbiol* 5:1–9. doi: 10.3389/fmicb.2014.00494
60. Sommer F, Bäckhed F (2013) The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* 11:227–38. doi: 10.1038/nrmicro2974
61. Martín R, Langa S, Reviriego C, et al (2004) The commensal microflora of human milk: New perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci Technol* 15:121–127. doi: 10.1016/j.tifs.2003.09.010
62. Newbourg D (2005) Innate immunity and human milk. *J Nutr* 135:1308–12.
63. Fernández L, S L, V M, et al (2013) The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res* 69:1–10. doi: 10.1016/j.phrs.2012.09.001.
64. Alexopoulos C, Karagiannidis A, Kritas SK, et al (2001) Field evaluation of a bioregulator containing live *Bacillus cereus* spores on health status and performance of sows and their litters. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 48:137–145. doi: 10.1046/j.1439-0442.2001.00342.x
65. Alexopoulos C, Georgoulakis IE, Tzivara A, et al (2004) Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters. *J Anim Physiol Anim Nutr* 88:381–392. doi: 10.1111/j.1439-0396.2004.00492.x
66. Salgin B, Norris SA, Prentice P, et al (2015) Even transient rapid infancy weight gain is associated with higher BMI in young adults and earlier menarche. *Int J Obes* 39:939–944. doi: 10.1038/ijo.2015.25
67. Bouret S, Levin BE, Ozanne SE (2015) Gene-environment interactions controlling energy and glucose homeostasis and the developmental origins of obesity. *Physiol Rev* 95:47–82. doi: 10.1152/physrev.00007.2014
68. Park SY, Cho SA, Lee MK, Lim SD (2015) Effect of *Lactobacillus plantarum* FH185 on the reduction of adipocyte size and gut microbial changes in mice with diet-induced obesity. *Korean J Food Sci Anim Resour* 35:171–178. doi: 10.5851/kosfa.2015.35.2.171
69. Park S, Seong K, Lim S (2016) Anti-obesity effect of yogurt fermented by *Lactobacillus plantarum* Q180 in diet-induced obese rats. *Korean J Food Sci Anim Resour* 36:77–83. doi: 10.5851/kosfa.2016.36.1.77
70. Okubo T, Takemura N, Yoshida A, Sonoyama K (2013) KK/Ta Mice administered *Lactobacillus plantarum* strain No. 14 have lower adiposity and higher insulin sensitivity. *Biosci Microbiota Food Heal* 32:93–100. doi: 10.12938/bmfh.32.93

71. Endres JR, Qureshi I, Farber T, et al (2011) One-year chronic oral toxicity with combined reproduction toxicity study of a novel probiotic, *Bacillus coagulans*, as a food ingredient. *Food Chem Toxicol* 49:1174–1182. doi: 10.1016/j.fct.2011.02.012

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento oral com *L. plantarum* Lp62 mostrou efeitos antinociceptivos principalmente na fase neurogênica no grupo de animais fêmeas e machos tratados, e redução do edema proveniente de nocicepção neurogênica no grupo de fêmeas tratadas. A atividade anti-inflamatória do micro-organismo também foi observada no grupo de animais machos tratados. Entretanto, os efeitos de *L. plantarum* Lp62 foram menores nos ratos machos adultos não tratados provenientes da ninhada de fêmeas tratadas. Assim, o presente estudo forneceu evidências de que o *L. plantarum* Lp62 apresenta atividade anti-inflamatória e antinociceptiva quando administrado por via oral aos camundongos, e mais estudos devem ser conduzidos para melhor elucidar seu mecanismo de ação e toxicologia.

ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética



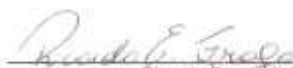
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Instituto Multidisciplinar em Saúde
Campus Anísio Teixeira
Comissão Em Uso de Animais (CEUA)



Página 1 de 1

PROJETO DE PESQUISA – 2ª Reapreciação em 03/05/2016
Título: Avaliação da atividade probiótica de <i>Lactobacillus</i> isolados da fermentação de amêndoas de cacau.
Protocolo: 035/2015
Pesquisador: Regiane Yatsuda.
Instituição: Instituto Multidisciplinar em Saúde - Campus Anísio Teixeira – UFBA
PARECER DO RELATOR
Data da Relatoria: 20 de abril de 2016
A docente Regiane Yatsuda apresenta resposta ao parecer aprovado pela CEUA-IMS-UFBA acrescentando ao processo um novo projeto e um novo formulário unificado e anexo referente a artigos científicos utilizados para a definição do número de animais por grupo. As adequações sugeridas para a segunda avaliação desta proposta e os devidos ajustes foram: 1. Ajustar a data de início do projeto; O projeto foi ajustado com início para 20/04/2016 e término para 01/03/2019. 2. Apresentar cronograma de execução; Foi acrescentado cronograma de execução onde no primeiro ano acontecerão as atividades vinculadas testes in vitro para atividade anti-cárie; testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético; recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal; avaliação do peso da ninhada e da atividade galactagoga; avaliação antimicrobiana de <i>Lactobacillus plantarum</i> ; avaliação do modelo experimental de alergia respiratória e de ferida excisional. No segundo ano as atividades vinculadas com testes in vitro para atividade anti-cárie; recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal; avaliação do peso da ninhada e da atividade galactagoga; avaliação da composição do leite; análise histológica das glândulas mamárias; avaliação antimicrobiana de <i>Lactobacillus plantarum</i> ; quantificação de citosinas. No terceiro ano aconteceram as atividades vinculadas com os testes in vitro para atividade anti-cárie e os modelos experimental de alergia respiratória e de ferida excisional. 3. Acrescentar os artigos de Dany (2010) e Scheibe (2008) utilizados na justificativa da definição do número de animais por grupo; Foi acrescentado os artigos em anexo. 4. Ajustar o grau de invasividade; Foi ajustado para o grau de invasividade 02 – exposições a níveis não letais de compostos químicos que não causem reações adversas graves – para os itens referentes a testes das contorções induzidas por ácido acético. 5. Ajustar no projeto o número de animais por caixa Foi ajustado para 06 camundongos por caixa e um rato por caixa. Após a reavaliação dos pontos apresentados e por esta de acordo com os princípios éticos na experimentação de animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) sugiro a APROVAÇÃO da presente solicitação. Parecer do Relator: Aprovado sem restrições.
PARECER CONSUBSTANCIADO CEUA E CONSIDERAÇÕES FINAIS:
Este parecer do relator foi apreciado na 12ª Reunião Ordinária do dia 03 de maio de 2016, sendo aprovado por unanimidade. Esse parecer indica que o projeto foi aprovado e a pesquisa já pode ser iniciada imediatamente. Status Final deste Parecer: Aprovado sem restrições.

Vitória da Conquista, 03 de maio de 2016.


Ricardo Evangelista Fraga
Coordenador CEUA-IMS-UFBA

CEUA-IMS-UFBA - Rua Rio de Contas, 55 - Quadra 17 - Lote 58 - Bairro Candonga
Vitória da Conquista - BA - CEP 45.029-094 Fone: (77) 3429 2700. E-mail: ceuamsufba@ufba.br

