

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS**

GLADISTONE CORREIA MESSIAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GALACTAGOGA DO
MICRORGANISMO PROBIÓTICO *Lactobacillus plantarum*
ISOLADO DA FERMENTAÇÃO DE AMÊndoAS DE
CACAU**

Vitória da Conquista, BA
2017

GLADISTONE CORREIA MESSIAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GALACTAGOGA DO
MICRORGANISMO PROBIÓTICO *Lactobacillus plantarum*
ISOLADO DA FERMENTAÇÃO DE AMÊndoAS DE
CACAU**

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

Orientadora: Profa. Dra. Regiane Yatsuda
Universidade Federal da Bahia – UFBA

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

Vitória da Conquista - BA

2017

GLADISTONE CORREIA MESSIAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GALACTAGOGA DO
MICRORGANISMO PROBIÓTICO *LACTOBACILLUS*
PLANTARUM ISOLADO DA FERMENTAÇÃO DE
AMÊNDOAS DE CACAU**

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, 31 de março de 2017.

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

Prof. Dr. Lucas Miranda Marques
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Bruno Lopes
Universidade Federal da Bahia

Dedico este trabalho

A **Deus**, que sempre me guiou e abençoou durante toda minha vida, especialmente
agradeço e dedico este trabalho.

Aos meus pais, **Antônio**, que estará sempre vivo em meu coração e **Maria da Glória**,
meus maiores apoiadores e fonte de inspiração e respeito.

Ao meu irmão, **Guilherme**, que é para mim um companheiro insubstituível e um grande
amigo.

A **Regiane**, por ter me ensinado tanto, dentro e fora da universidade.

As **meninas do leite**, por se dedicarem e terem tornado tudo isso possível.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que sempre me abriu portas e encheu minha vida de luz e sabedoria, agradeço imensamente por me guiar em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais, **Antônio** e **Maria da Glória**, que me deram amor e me ensinaram a ser quem sou hoje. Agradeço tudo, todo amor ofertado.

Ao meu irmão, **Guilherme**, agradeço pela amizade e sei que posso contar com você a todo momento.

A minha orientadora, **Regiane Yatsuda**, que antes de mais nada é minha grande amiga. Obrigado por ter me acolhido e me ensinado tanto, você é meu exemplo de dedicação e profissionalismo, mas também de amizade.

A **Érika**, minha fortaleza, irmã e alegria durante o mestrado. Muito obrigado pela imensa ajuda, imenso amor e companheirismo. Você foi e sempre será meu tesouro guardado comigo onde eu estiver.

A **Kelle**, que considero minha madrinha acadêmica e amiga. Obrigada pelos belos conselhos, pelos constantes “volta para terra, Gladis”, pelas conversas acalentadoras.

A **MariLuze**, minha luz em momentos de desespero, meu ombro amigo. Foram tantas coisas boas vividas ao seu lado que tenho certeza que meu coração hoje é mais feliz e por sua causa.

A **Manoela**, minha companheira de luta no projeto! Agradeço tanto por ter você comigo, sua amizade e ajuda me permitiram chegar até aqui.

A **Aracely**, o que seria de mim sem o seu desespero? Nada! Agradeço imensamente pelos momentos vividos e pela amizade.

A **Nayara**, minha companheira de curvas de crescimento, de alegrias e de sufoco! Este trabalho tem muita ajuda sua e eu só tenho a agradecer por tudo.

As **meninas do leite**, uma família que fiz durante este período. Agradeço pelos inóculos feitos, pelas gavagens diárias, pela dedicação imensurável. A **Ana Marta**, que transformou todo o ódio em puro amor à segunda, ou terceira vista; **Dhaisa**, representante da diretoria, sempre presente e disposta a tudo; **Marina**, cozinheira maravilhosa, responsável e carinhosa; **Erika**, dedicada e com aquela risada maravilhosa que encanta; **Rayra**, espontânea e dona de belas histórias; **Mara**, que chegou a pouco tempo mas já é diretoria; **Ana Marques**, minha sanfoneira especial, a famosinha do projeto; **Patrícia**, que era tímida mas se tornou minha certeza de belas risadas e dias felizes; **Nayonara**, outra certeza de boas risadas e belas histórias; **Julian**, minha

novatinho, seu coração rebelde é espetacular; **Ingrid**, minha modelinha, pequena de coração grande; **Thay Matos**, minha sobrevivente sem-pulmão queridíssima; **Thay Barros**, calma, serena e dedicada; **Lua**, meu brotinho, companheira das melhores festas; **Beatriz**, meu deus, você é sensacional. Somos família, somos diretoria, somos tudo! Amo vocês.

Aos **alunos do projeto**, agradeço pelas inúmeras ajudas e pela disposição de todos que permitiram realizar este trabalho.

Aos **inúmeros amigos**, vocês são essenciais para mim.

Aos **professores do Biociências**, por serem grandes mestres

Ao **Programa Pós-Graduação em Biociências** e à **Universidade Federal da Bahia** pelo privilégio concedido em realizar esse mestrado.

A **instituição de financiamento**, Fundação de Amparo à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado da Bahia (FAPESB).

Ao **programa Erasmus+**, que me concedeu o intercâmbio.

A **Universidade de Luxemburgo**, que me acolheu durante o intercâmbio.

*Santo anjo do Senhor
meu zeloso guardador.
Se a ti me confiou a piedade divina,
 sempre me rege,
 me guarde,
 me governe,
 me ilumine,
 Amém.*

CORREIA MESSIAS, Gladistone. Avaliação da atividade galactagoga do microrganismo probiótico *Lactobacillus plantarum* isolado da fermentação de amêndoas de cacau 2017. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2017.

RESUMO

Os probióticos são microrganismos, que mostram efeitos benéficos para a saúde nos hospedeiros uma vez consumidos em quantidades suficientes. *Lactobacillus plantarum* Lp62 é uma cepa de bactérias ácido-lácticas (BAL) que foram isoladas a partir de amêndoas de cacau e apresentam potencial probiótico. Assim, foi determinada a influência de uma suplementação oral de *L. plantarum* Lp62 no crescimento de filhotes de rata Wistar, na produção e na composição do leite. **Métodos** *Lactobacillus plantarum* Lp62 foi administrado diariamente por gavagem em ratas Wistar ($N = 8$), a partir do 7º dia antes do parto e durante 20 dias durante a lactação, em uma concentração de $7,2 \times 10^9$ UFC/mL. A mãe e os filhotes foram pesados para avaliar o desempenho do crescimento. O leite foi coletado no dia 19 e avaliado a composição de proteína, triglicérides, colesterol e lactose por ensaios colorimétricos. As glândulas mamárias das ratas em lactação foram removidas para análise histológica. **Resultados** A suplementação com *L. plantarum* mostrou diferenças significativas no peso dos filhotes ($p < 0,05$). A produção de leite não foi afetada por *L. plantarum*, mas a composição foi afetada pelo aumento de proteína, triglicérides e colesterol ($p < 0,05$). A concentração de lactose não foi afetada pelo tratamento ($p > 0,05$). Não houve diferença significativa na média de alvéolos, ductos, lóbulos ou vasos sanguíneos entre os tratamentos. **Conclusões** Os resultados mostram que *L. plantarum* Lp62 foi eficaz no aumento do conteúdo nutricional do leite de ratas possivelmente melhorando a digestão.

Palavras-chave: *Lactobacillus plantarum*. Probiótico. Galactagogue. Leite.

CORREIA MESSIAS, Gladistone. Evaluation of the galactagogue activity of the probiotic microorganism *Lactobacillus plantarum* isolated from the fermentation of cocoa beans 2017. Dissertation (Master) – Multidisciplinary Health Institute, Federal University of Bahia, Vitória da Conquista, 2017.

ABSTRACT

Probiotics are microorganisms, which show beneficial health effects on hosts once consumed in sufficient amounts. The *Lactobacillus plantarum* Lp62 is a lactic acid bacteria (LAB) strains that have been isolated from cocoa beans and exhibit probiotic potential. Thus, the influence of an oral supplementation of *L. plantarum* Lp62 on the growth of Wistar rat's pups, on yield and milk composition was determined. **Methods** *Lactobacillus plantarum* Lp62 was administered daily by gavage in Wistar rats (N=8), from the 7th day before delivery and for 20 days during lactation, in a concentration of 7.2×10^9 CFU/mL. The dam and pups were weighed to evaluate growth performance. The milk was collected at 19th day and evaluated the protein, triglycerides, cholesterol and lactose composition by colorimetric assays. The mammary glands of lactating rats were removed for histological analysis. **Results** The supplementation with *L. plantarum* showed significant differences on the weight of puppets ($p < 0.05$). The milk production was not affected by *L. plantarum*, but the composition was affected by increasing protein, triglycerides and cholesterol ($p < 0.05$). Lactose concentration was not affected by the treatment ($p > 0.05$). There was no significant difference in the means of alveoli, ducts, lobules or blood vessels between treatments. **Conclusions** The findings show that *L. plantarum* Lp62 was effective in increasing nutritional content of milk of rats possibly by enhancing the digestion.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*. Probiotic. Galactagogue. Milk.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Esquema de tratamento.....	31
Figura 2	Estimativa da produção de leite em 1 hora.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IL-6 – Interleucina 6
IL-10 - Interleucina 10
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
TGF- β – Fator de transformação do crescimento Beta
UFC – Unidade formadora de colônia
INF- γ – Interferon gamma
Th1 – T helper 1
IgE - Imunoglobulina E
BAL - Bactérias ácido-láticas
TGI - Trato gastrointestinal
pH – Potencial hidrogeniônico
IgA – Imunoglobulina A
SCD14 – Cluster de diferenciação solúvel 14
IL-1 – Interleucina 1
GM-CSF – Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos
IL-8 – Interleucina 8
NK – Natural Killer
Th2 – T helper 2
MRS – deMan, Rogosa e Sharpe
CO2 – Dióxido de carbono
rRNA - RNA ribossômico
NaCl – Cloreto de sódio
P1 – Peso 1
P2 – Peso 2
P3 – Peso 3
Mg – Miligrama
Kg – Kilograma
G – grama
Nm – Nanômetro
 μm – Micrômetro

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	13
2.1	Microrganismos Probióticos	14
2.2	Bactérias Ácido-Láticas	16
2.3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	17
2.4	Microbiota.....	19
2.5.1	Componentes do leite materno	22
2.5.1.1	Macronutrientes.....	22
2.5.1.2	Componentes imunológicos	23
2.5.1.3	Diversidade bacteriana do leite materno e circulação enteromamária	25
2.6	A glândula mamária de murinos e suas modificações	27
2.7	Atividade galactogogo	28
3.	JUSTIFICATIVA.....	29
4.	OBJETIVOS	29
4.1	Objetivo geral.....	29
4.2	Objetivos específicos.....	29
5.	METODOLOGIA	29
5.1	Microrganismo	30
5.2	Animais	30
5.3	Avaliação do peso da ninhada e a atividade galactogogo do microrganismo probiótico ..	31
5.4	Análise da composição bioquímica do leite das ratas tratadas com microrganismo probiótico	32
5.5	Análise histológica das glândulas mamárias	34
6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
7.	REFERÊNCIAS	36
	ANEXO.....	76

1. INTRODUÇÃO

Os probióticos são alimentos considerados funcionais, ou seja, são alimentos que produzem efeitos benéficos à saúde. Define-se probiótico atualmente como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro”. Os efeitos benéficos desses microrganismos estão direta e exclusivamente relacionados ao tipo da cepa utilizada (FAO/WHO, 2001).

Os probióticos tem comportamento comensal e competem com os patógenos pelos nutrientes existentes no intestino grosso e, pelo efeito barreira, aderem-se à mucosa, impedindo a colonização por microrganismos potencialmente patogênicos. Os probióticos podem também interagir com as células epiteliais e também exercem efeito sobre as células do sistema imunológico do intestino, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumentando a produção de citocinas anti-inflamatórias. Desse modo, na condição predominante no intestino, equilibram a microbiota e protegem o hospedeiro (RIOUX; MADSEN; FEDORAK, 2005).

A alimentação exclusiva com leite materno é, reconhecidamente, a melhor forma de proteger o recém-nascido das enfermidades infecciosas. Sabe-se que uma fonte adequada de leite materno é essencial para uma função ótima da barreira mucosa durante os primeiros meses de vida (BOTTCHER et al., 2000). Parte dessa proteção se deve, provavelmente também, desta influência que o leite materno tem sobre a composição da microbiota intestinal do recém-nascido (CHATTHA et al., 2013) e dos vários componentes imunológicos que contrabalançam a imaturidade do sistema imunitário do lactente incluindo as células do sistema imunológico, os anticorpos, as citocinas pró e anti-inflamatórias, tais como IL-6, IL-10, TNF- α e TGF- β (BOTTCHER et al., 2000; GAROFALO, 2010) e os lactobacilos e as bifidobactérias que são fornecidos pelo leite (FERNÁNDEZ et al., 2013).

Assim, apesar dos inúmeros estudos com probióticos, inclusive demonstrando que a administração de fórmula suplementada com prebióticos e probióticos pode ser associada com alguns benefícios clínicos, tais como redução do risco de infecções intestinais inespecíficas, risco reduzido de utilização de antibióticos e menor frequência de cólica e irritabilidade (BRAEGGER et al., 2011). Porém, há uma quantidade limitada de evidências científicas para o estabelecimento seguro sobre sua efetividade para tirar conclusões confiáveis a partir dos dados disponíveis. Diante deste contexto o objetivo é avaliar o uso terapêutico do *Lactobacillus plantarum* Lp62 obtido a partir da fermentação de amêndoas de cacau quanto à possível atividade galactogoga, alteração

na composição química e imunológica do leite e ganho de peso da ninhada em modelo experimental animal.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Microrganismos Probióticos

Existem evidências que estratégias nutricionais, como a manipulação da microbiota pela dieta, possam contribuir para diminuição de doenças do hospedeiro. Neste contexto, o uso de microrganismos probióticos tem se tornado uma grande área de interesse e parece ser uma importante ferramenta, atuando de diversas maneiras na prevenção e tratamento de doenças (BENGMARK; GIL, 2006; NG et al., 2009). O uso de probióticos surgiu no oriente médio, com a prescrição de iogurtes e fermentados como terapia para infecções do trato gastrintestinal e estimulante do apetite. O termo probiótico foi introduzido por Lily e Stillwell pela primeira vez em 1965, foi definido como aquele fator de origem microbiológica que estimula o crescimento de outros microrganismos. Em 1989, Roy Fuller destacou o fato que para ser considerado probiótico, o microrganismo em questão devia estar presente em estado viável e introduziu a ideia de ter um efeito benéfico para o hospedeiro (GUARNER et al., 2011).

Define-se probiótico como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2001). Esses efeitos benéficos estão direta e exclusivamente relacionados ao tipo da cepa utilizada, e não podem ser generalizados para toda a espécie, nem para todo grupo de bactérias ácido-láticas ou outros probióticos. Além disso, a dose de probióticos necessária varia muito em função da cepa utilizada, esta deve possuir efeitos benéficos ao hospedeiro demonstrados *in vivo* e *in vitro*. Embora muitos produtos de venda livre contendo probióticos proporcionem entre 1-10 bilhões de UFC/dose, alguns produtos demonstraram ser eficazes em níveis mais baixos, enquanto outros requerem quantidades maiores (GUARNER et al., 2011). Existem ainda, trabalhos recentes indicando que não somente microrganismos vivos são capazes de promover benefícios à saúde do hospedeiro, mas também o uso de microrganismos não viáveis ou componentes celulares são capazes de influenciar positivamente a saúde do hospedeiro (TAVERNITI; GUGLIELMETTI, 2011).

Os probióticos devem apresentar segurança comprovada, ou seja, possuir baixo risco de infecção sistêmica e de produção de toxinas deletérias, não oferecer estímulo excessivo à resposta imunológica, não possibilitar a transferência de genes entre microrganismos, possuir a garantia da manutenção da viabilidade até o momento do consumo na forma de cápsula, pó ou quando adicionada a produtos lácteos, resistir à acidez gástrica e à ação dos sais biliares, ter capacidade de adesão ao muco ou epitélio intestinal, potencial atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas e capazes de reduzir a adesão de patógenos (FAO/WHO, 2001). Historicamente, lactobacilos e bifidobactérias associados com alimentos têm sido considerados seguros e ocorrem normalmente como comensais na microbiota de mamíferos. Entretanto, teoricamente, alguns probióticos podem ser responsáveis por efeitos adversos: infecções sistêmicas, atividades metabólicas deletérias, estimulação imune excessiva em indivíduos suscetíveis e transferência de genes (MARTEAU, 2002).

São muitas as doenças em que os probióticos desempenham seus efeitos benéficos. Durante os últimos anos, diversos estudos clínicos e experimentais foram publicados demonstrando a capacidade de promoção de saúde destes microrganismos, embora apresentem efeitos geralmente sutis quando comparados com drogas farmacêuticas. Em doenças específicas, como a diarreia aguda em crianças e a diarreia associada à antibióticos, os efeitos dos probióticos são fáceis de reconhecer, porém, a utilização de probióticos no grupo de doenças inflamatórias intestinais, tais como a doença de Crohn e a colite ulcerativa tem mostrado ótima atividade como agentes de suporte terapêutico (CLAES et al., 2011).

A cepa de *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN), demonstrou manter a remissão dos sintomas em pacientes com colite ulcerativa e mostrou ser equivalente ao tratamento padrão com mesalazina (REMBACKEN et al., 1999; KRUIS et al., 2004). A administração da cepa de EcN também melhorou os sintomas em modelo de colite quimicamente induzida com dextrano sulfato de sódio, com uma clara redução de citocinas pró-inflamatórias como INF- γ e IL-6 (SCHULTZ et al., 2004). A administração oral de mistura contendo *Bifidobacterium lactis* 303, *Lactobacillus acidophilus* LA 201, *L. plantarum* LA 301 e *Lactobacillus salivarius* LA 302 para ratos resultou em efeito protetor, demonstrando reduzir os sintomas de colite induzida por álcool (DROUAULT-HOLLOWACZ et al., 2006).

Além da atuação na área das doenças inflamatórias intestinais, estudos correlacionam a administração de probióticos com efeitos positivos sobre o sistema imune do hospedeiro (SILVA et al., 2012). Em estudo animal, utilizando modelo com ratos, foi demonstrado que *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 foi capaz de induzir o perfil Th1 e respostas regulatórias *in vitro* (WEID; BULLIARD; SCHIFFRIN, 2001). A cepa de *L. paracasei* NCC 2461 também suprimiu a inflamação das vias aéreas e regulou negativamente as respostas imunes alérgeno-específico (SCHABUSSOVA et al., 2011). Gestantes foram suplementadas com probióticos, 2 a 4 semanas antes do parto e seus filhos apresentaram baixos níveis de IgE associadas com eczema tópico em crianças (ABRAHAMSSON et al., 2007). Estudos mostram que os resultados são dependentes das cepas utilizadas e o período de administração do probiótico parece influenciar no desenvolvimento da alergia (HUANG et al., 2010).

2.2 Bactérias Ácido-Láticas

Bactérias ácido-láticas (BAL), representam a maior parte da microbiota comensal do trato gastrointestinal humano e são frequentemente utilizados como probióticos, isolados ou em combinação com produtos fermentados. *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium* são os mais utilizados como probióticos e estão disponíveis de diversas formas para o consumo (CHIANG; PAN, 2012). BAL compreendem um grupo de bactérias gram-positivas, ácido-tolerantes, geralmente não esporuladas, microarofílicas e usualmente não apresentam motilidade. Estas bactérias produzem ácido láctico como o principal produto final da fermentação de carboidratos. Esta característica tem ligado BAL com a fermentação dos alimentos, pois, a acidificação inibe o crescimento de agentes de deterioração (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

O ácido láctico e outros produtos metabólicos produzidos contribuem para o perfil organoléptico e textura de um item alimentar (CAPLICE; FITZGERALD, 1999). BAL inclui vários gêneros importantes, incluindo *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp, *Lactococcus* spp, *Lactosphaera* spp, *Leuconostoc* spp, *Melissococcus* spp, spp *Oenococcus*, *Pediococcus* spp, *Streptococcus* spp, e *Enterococcus* spp (CARR; CHILL; MAIDA, 2002). Nos últimos anos, vários relatórios descreveram os efeitos benéficos de BAL, como a regulação da microbiota intestinal, inibição ou prevenção de patógenos no trato gastrointestinal (TGI), o aumento da imunidade da mucosa intestinal e manutenção

da função da barreira intestinal (ALEXOPOULOS et al., 2004; RAUCH; LYNCH, 2010).

Muitas cepas de lactobacilos são utilizadas na fermentação de alimentos, e possuem um complexo requisito nutricional e são encontrados em diversos habitats, tais como membranas de mucosas humanas e animais, material vegetal e leite fermentado. Eles são importantes para aumentar a imunidade, manutenção do equilíbrio microbiano intestinal e na prevenção de infecções gastrintestinais. Em modelos murinos, muitas cepas de *Lactobacillus* melhoraram tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa através da indução da maturação de células dentríticas, estimulação dos linfócitos à produção de citocinas pró-inflamatórias (DE VRESE; SCHREZENMEIR, 2008; CHIANG; PAN, 2012).

Os efeitos dos lactobacilos na microbiota intestinal e fermentação incluem a inibição da aderência e crescimento de patógenos por secreção de lactato e ácidos graxos de cadeia curta para diminuir o pH luminal, fluxo sanguíneo do cólon e crescimento de células epiteliais (CHIANG; PAN, 2012). Estes probióticos também são responsáveis pela redução da inflamação intestinal em modelo murinho de colite. Estes resultados indicam que a produção de ácido láctico destes probióticos estimula o consumo de lactato e a produção de butirato pelas bactérias, resultando num aumento de ácidos graxos de cadeia curta, como o butirato, que possuem atividade anti-inflamatória (CLAES et al., 2011).

2.3 *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum é um microrganismo membro do grupo heterofermentativo facultativo de lactobacilos. Muitas cepas de *L. plantarum* foram isoladas a partir de habitats tradicionais de lactobacilos, tais como plantas, vegetais, peixes, carne e outros alimentos fermentados. Além disso, também é encontrado no trato gastrointestinal humano (AHRNÉ et al., 1998; DE VRIES et al., 2006). *L. plantarum* produz acetato e lactato sob condições anaeróbias e possui a capacidade de catabolizar a arginina, gerando óxido nítrico, sendo este, um microrganismo inteiramente dependente da disponibilidade de glicose e arginina para seu crescimento (BENGMARK, 1998). O alto número de proteínas de superfície ancoradas sugere que este microrganismo pode associar-se a diferentes e substratos. Adicionalmente, há

diversos genes que codificam funções regulatórias, indicando assim, a capacidade de se adaptar a diversas condições diferentes (DE VRIES et al., 2006).

Diversos relatos apontam para o uso seguro do microrganismo *L. plantarum*, apenas alguns casos apontam que algumas cepas de *L. plantarum* podem estar envolvidas em infecções. Um dos casos diz respeito ao isolamento de *L. plantarum* de uma endocardite infecciosa. Estudos in vitro demonstram capacidade de agregação plaquetária, resultando em coagulação sanguínea, porém, estes estudos podem não refletir em algum dano in vivo, pois, diversas cepas de bactérias ácido-láticas compartilham dessa propriedade (DE VRIES et al., 2006; HARTY et al., 1994). Após uma injeção intravenosa contendo 10^8 UFC de *Lactobacillus plantarum* 299v em ratos Sprague Dawly, não foi possível recuperar este microrganismo a partir do coração e do sangue, dos ratos sacrificados 96h após a injeção. Desta maneira, mesmo se o microrganismo atravessar a barreira intestinal, não há bacteremia, mostrando assim, uma aparente segurança quanto à utilização deste lactobacilo (DIYA et al., 2002).

Estudos demonstram diversas atividades biológicas do *Lactobacillus plantarum*, tais como o observado no estudo de Nguyen (2007), que demonstraram que camundongos alimentados com *Lactobacillus plantarum* PH04 apresentaram taxas de colesterol total e triglicerídeos 7 e 10% menores respectivamente quando comparados com grupo controle. Nesse estudo, não foram encontradas diferenças no peso corporal, ingestão de alimentos, peso visceral ou diferenças no comportamento entre os grupos testados. A administração oral do *L. plantarum* PH04 não resultou em nenhum efeito adverso, houve, contudo, translocação bacteriana semelhante entre os dois grupos de animais, este processo é resultante da translocação de bactérias intestinais através da mucosa, com invasão de outros tecidos (NGUYEN; KANG; LEE, 2007).

O estudo de meta-análise realizado por Million e colaboradores (2012) investigou o efeito de espécies de *Lactobacillus* sobre o ganho de peso em humanos e animais avaliados em 82 estudos. Observou-se que *L. plantarum* apresentou ter significante efeito antiobesidade. Este efeito foi consistente com ausência de ganho de peso em indivíduos magros. Um estudo que avaliou efeitos sobre o ganho de peso e a microbiota intestinal de ratas e seus filhotes, alimentados com dieta de alta energia e suplementados com *L. plantarum* 15313, da vida fetal até 6 meses de idade, demonstrou de perda de peso (KARLSSON et al., 2011).

Houve uma redução significativa da contagem de bactérias anaeróbicas e de gram-negativos anaeróbicos do reto de voluntários saudáveis que consumiram alimento diariamente contendo diferentes cepas de lactobacilos. Obteve-se similar redução de bactérias gram-negativas com a administração do *Lactobacillus plantarum* E98 *in vitro* (ALANDER et al., 1999). A redução de bactérias gram-negativas é considerada uma vantagem, visto que essas bactérias são isoladas de sítios infectados em cirurgias intestinais (NICHOLS; SMITH, 1994).

2.4 Microbiota

Os animais nascem sem qualquer tipo de microrganismo associado, sendo esta, uma situação transitória. Por ocasião do nascimento, uma colonização das superfícies internas e externas do corpo ocorre rapidamente após o parto com microrganismos oriundos da mãe, alimento e ambiente (NICOLI; VIEIRA, 2004; FERREIRA et al., 2010). Contrapondo-se à percepção da ausência de microrganismos no feto, demonstrou-se a presença de DNA bacteriano na placenta e no cordão umbilical (ARDISSONE et al., 2014; JIMENEZ et al., 2005; SATOKARI et al., 2009). Além disso, a identificação de algumas bactérias no meconíio explica a origem dos primeiros microrganismos colonizadores do intestino, antes mesmo do nascimento, possivelmente como um mecanismo adaptativo para o desenvolvimento do intestino fetal fora do organismo materno (JIMENEZ et al., 2008). Infelizmente, faltam estudos para determinar a importância deste processo na colonização inicial e seu impacto no desenvolvimento do intestino.

Muitos microrganismos não conseguem colonizar “habitats” do trato gastrointestinal dos neonatos, porém, outros tipos de microrganismos são os pioneiros que criaram condições para a colonização de outros que formaram a microbiota do adulto. Quando os pioneiros colonizam os “habitats” estéreis, uma sequência de eventos começa. A sequência de colonização é constante e característica de cada espécie, com somente algumas variações dependendo do tipo de parto, das condições sanitárias do ambiente, hospitalização, tratamento com antibióticos, do tipo de alimento recebido e outros fatores que possam influenciar na composição da microbiota do recém-nascido (FALK et al., 1998; FERREIRA et al., 2010; NICOLI, 1995; NICOLI; VIEIRA, 2004).

O termo microbiota intestinal refere-se ao ecossistema essencialmente bacteriano que reside normalmente nos intestinos do homem. Essa microbiota é

adquirida desde o nascimento, pelo canal do parto, e sua composição definitiva é obtida em torno dos dois anos de idade, acompanhando o ser humano por toda sua vida. A microbiota intestinal desempenha inúmeras funções, embora apenas recentemente, muitas começam a ser conhecidas. A composição da microbiota ainda é bastante desconhecida, pois, calcula-se que pelo menos 40% das suas espécies não foram cultivadas (FERREIRA et al., 2010).

O trato gastrointestinal dos mamíferos abriga uma comunidade bacteriana extremamente diversa e densa, podendo ser colonizada por cerca de 10^{14} células microbianas indígenas procariotas e eucariotas. Toda essa comunidade microbiana pode se localizar no lúmen, nas criptas de Lieberkuhn ou na superfície do epitélio intestinal em qualquer parte do trato digestivo e seu estabelecimento e manutenção compreende um complexo processo, influenciado por diversos fatores, como: dieta, idade, utilização de antibióticos, utilização de probióticos e prebióticos, ambiente, microbiota materna, via do parto, interações microbianas, interações microrganismo-hospedeiro, dentre outros (FERREIRA et al., 2010).

Os primeiros microrganismos a serem isolados a partir das fezes de recém-nascidos são microrganismos anaeróbios facultativos normalmente; Em neonatos, *Escherichia coli*, *Clostridium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Bacteroides spp.*, e *Bifidobacterium spp.* predominam (ROTINI; DUERDEN, 1981). Estes microrganismos alteram o trato gastrointestinal inicialmente aeróbio para um ambiente anaeróbio, que é adequado para a colonização por organismos anaeróbios obrigatórios. Uma vez que o intestino se tornou anaeróbico, bifidobactérias, Clostrídios e *Bacteroides spp.* aparecem nas fezes (OUWEHAND; ISOLAURI; SALMINEN, 2002). Em condições normais, a microbiota intestinal materna funcionará como a principal fonte de bactérias que colonizarão efetivamente o TGI do recém-nascido (FALK et al., 1998).

Os diversos microrganismos da microbiota gastrointestinal de animais estão presentes em diferentes níveis populacionais em um determinado tempo e local. A diferença entre microbiota dominante e sub-dominante e a microbiota residual é importante do ponto de vista funcional, visto que é estabelecido que uma população microbiana no trato digestivo só tem efeito no hospedeiro quando ela está em níveis maiores que 10^7 - 10^8 UFC/g de conteúdo. Abaixo desses valores, os metabolitos produzidos não são suficientes para agir no hospedeiro (NICOLI; VIEIRA, 2004). A

microbiota intestinal dominante apresenta um perfil específico para cada espécie animal, porém, a microbiota residual difere consideravelmente de um indivíduo para o outro, numa mesma espécie animal (NICOLI, 1995).

A aquisição da microbiota comensal depois do nascimento promove e regula o sistema imune, e estabelece a homeostase intestinal. Este estágio crítico é decisivo para a caracterização da resposta imune neonatal. O método de parto tem uma influência pronunciada na colonização do intestino do lactente. Verificou-se que a colonização fecal dos bebês nascidos por cesariana é atrasada em comparação a bebês nascidos por via vaginal. Além disso, a composição da microbiota fecal foi diferente após cesariana (KLEESSEN; BEZIRTZOGLOU; MATTO, 2000; GRÖNLUND et al., 2012). Além da via do parto, o leite materno tem influência sobre a composição da microbiota intestinal do recém-nascido. A menor taxa de infecções gastrointestinais em bebês amamentados do que alimentados por fórmula pode ser atribuído, não só devido os anticorpos presentes no leite materno, mas também pela colonização da microbiota intestinal por comensais promovida pelo leite materno, anticorpos maternos e diversos componentes biológicos solúveis (CHATTHA et al., 2013).

2.5 Leite materno e os estágios da Lactação

O colostrum é o primeiro fluido produzido pelas lactentes, apresenta volume, aparência e composição distinta do leite maduro, contém uma alta concentração de proteínas e oligossacarídeos, enquanto o leite maduro possui altos níveis de lipídeos e caseínas. O colostrum é produzido no pós-parto em pequenas quantidades, contém relativamente, uma baixa concentração de lactose, porém é rico em fatores antimicrobianos e fatores que afetam o sistema imune, como IgA, citocinas, lactoferrina, lactoperoxidase, oligossacarídeos, defensinas, bactérias comensais e leucócitos, bem como fatores de desenvolvimento, indicando suas principais funções imunológicas e tróficas em vez de nutricional (NEWBURG, 2005; HURLEY; THEIL, 2011; BALLARD; MORROW, 2013; FERNÁNDEZ et al., 2013).

A produção do leite de transição inicia com o aumento da concentração de lactose e ocorre tipicamente durante os primeiros dias pós-parto. O leite de transição compartilha algumas características com o colostrum, mas representa um período transicional até a produção de leite para suportar as necessidades nutricionais e de desenvolvimento rápido do lactente. Após este período, o leite é considerado maduro e

permanece com composição relativamente semelhante durante toda a lactação (BALLARD; MORROW, 2013).

2.5.1 Componentes do leite materno

2.5.1.1 Macronutrientes

A riqueza nutricional do leite advém de muitos componentes, incluindo proteínas, lipídeos e carboidratos. A concentração destes macronutrientes do leite materno difere entre os diferentes mamíferos e é influenciada por diversos fatores, tais como dieta, peso da mãe, frequência de amamentação e paridade (BALLARD; MORROW, 2013; HENNET; BORSIG, 2016).

As proteínas do leite materno humano são uma importante fonte de aminoácidos para o lactente e são divididas em proteínas do soro, caseínas e mucinas. A fração proteica do leite desempenha numerosas atividades biológicas que beneficiam o lactente (LÖNNERDAL, 2003). Caseínas, α -lactoalbumina, lactoferrina, IgA, lisozima e albumina são as proteínas mais abundantes (BALLARD; MORROW, 2013). A maioria das proteínas são sintetizadas pela glândula mamária, com algumas exceções como, por exemplo, a albumina sérica, proveniente da circulação materna (LÖNNERDAL, 2003). A concentração de proteínas no leite de rata é estável na primeira semana de lactação, aumenta durante o período intermediário e começa a decair no início da lactação tardia. (KEEN et al., 1981).

Os lipídeos são a maior fonte de energia do leite materno e a fração de macronutrientes mais variável do leite, inclusive de acordo com a dieta materna, inclusive altas concentrações de lipídeos estão associadas com dietas pobres em proteínas (KEEN et al., 1981). O leite do final da amamentação possui de duas a três vezes mais lipídeos que o leite do início da amamentação, além de variar durante o dia (BALLARD; MORROW, 2013). Além do colesterol e triglicérides, a fração lipídica do leite contém diversos mediadores lipídicos, como as lipoxinas anti-inflamatórias (HENNET; BORSIG, 2016).

O principal carboidrato do leite materno humano é o dissacarídeo lactose. A concentração de lactose é a que menos sofre variações dos macronutrientes, porém altas concentrações de lactose foram encontradas em amostras de leite de lactantes que produzem altas quantidade de leite (BALLARD; MORROW, 2013). A outra fração de carboidratos do leite materno são os oligossacarídeos, que possuem uma concentração

variável a depender do estágio da lactação (BALLARD; MORROW, 2013; HENNET; BORSIG, 2016; LÖNNERDAL, 2003). Estudos demonstram que a concentração de carboidratos presente no leite materno de ratas aumenta do primeiro ao décimo quarto dia de lactação, seguido de pequenas variações até o vigésimo primeiro dia. A redução da ingestão de alimentos pela lactante diminui a concentração de lactose no leite de rata (KEEN et al., 1981).

2.5.1.2 Componentes imunológicos

A amamentação representa a continuidade da exposição do lactente ao ambiente imune materno. O leite materno é rico em fatores imunológicos que ajudam a asseguram a saúde e sobrevivência do lactente (AGARWAL et al., 2011). Estes fatores imunológicos presentes no leite são numerosos, diversos e multifuncionais, tais como células, imunoglobulinas, componentes antimicrobianos, interferons e citocinas. Esta variedade de células presente no leite inclui macrófagos, células T, linfócitos e células-tronco que provem uma poderosa proteção contra patógenos e estimulam o desenvolvimento do sistema imune do lactente. (AGARWAL et al., 2011; BALLARD; MORROW, 2013; JARVINEN; SUOMALAINEN, 2002).

O conteúdo de componentes bioativos presentes no leite é relevante e incluem as imunoglobulinas, citocinas, lactoferrina e oligossacarídeos que contribuem para proteção do lactente. Alguns desses fatores imunomodulatórios presentes no leite tais como TGF-β, sCD14, IL-1 e IL-6 são produzidos pelos leucócitos, e o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), produzidos pelas células epiteliais dos ductos mamários (AGARWAL et al., 2011; HENNET; BORSIG, 2016).

Imunoglobulinas foram as primeiras proteínas bioativas encontradas no leite materno. A principal imunoglobulina presente no leite é a IgA e seus níveis são maiores no colostrum do que no leite maduro, este alto nível presente no colostrum é essencial para contribuir na proteção do lactente que não possui um sistema imune maduro ao nascer (HURLEY; THEIL, 2011). A transferência de IgA, como forma de transferência de imunidade adaptativa da mãe para o lactente provê uma proteção direta contra patógenos até o sistema imune do lactente produzir níveis séricos suficientes de IgA (HENNET; BORSIG, 2016).

A lactoferrina é outro fator de proteção imune presente no leite, esta proteína possui capacidade antimicrobiana, induz a atividade fagocítica de macrófagos

(BALLARD; MORROW, 2013), além de formar quelatos de ferro, e ao mesmo tempo, reduzir o crescimento de certas bactérias que dependem do ferro e aumentar a absorção de ferro pelo lactente através da ligação ao receptor intestinal de lactoferrina (SUZUKI; SHIN; LONNERDAL, 2001). A suplementação de lactentes pré-termo com lactoferrina bovina, sozinha ou combinada com *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) reduziu significativamente o risco de sepse de início tardio (MANZONI et al., 2009).

A transferência de citocinas da mãe através da amamentação confere imunidade passiva ao lactente ao atravessar a barreira intestinal e influenciar as suas células imunes. Duas citocinas anti-inflamatórias, IL-10 e TGF-β, contribuem para a maturação da imunidade de mucosa e diminui o risco de doenças, incluindo alergia. IL-10 é produzida por monócitos ativados, células B, células T, bem como mastócitos. É uma citocina reguladora da resposta celular, suprimindo a resposta Th1 e aumentando a sobrevivência e proliferação de células B. O TGF-β, além de ser também uma citocina reguladora, atua no estímulo da produção de IgA em recém-nascidos (AGARWAL et al., 2011; GAROFALO, 2010).

Citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IL-6, IL-8 e IFN γ também são encontradas no leite materno, geralmente em baixos níveis que ainda decaem durante a lactação (BALLARD; MORROW, 2013). A TNF-α está envolvida em inflamações sistêmicas e desempenham funções imunológicas na glândula mamária e no lactente. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória e anti-inflamatória, produzida por fibroblastos, queratinócitos, macrófagos, células endoteliais e células T, que está envolvida na ativação da fase aguda da resposta imune. A IL-6 é capaz de promover a diferenciação de células B para produção de anticorpos. A IL-8 é uma importante componente da resposta inflamatória e da resposta inata, pois é uma importante citocina quimiotática de neutrófilos (AGARWAL et al., 2011).

O interferon gamma (IFN γ) é uma citocina secretada por células Th1, células dendríticas, células NK e outras (PROKESOVA et al., 2006). É responsável pelo aumento do perfil Th1/inflamatório, enquanto suprime o perfil Th2/resposta alérgica, além disso, possui múltiplos mecanismos de proteção do lactente. Devido à supressão do perfil Th2, a presença de IFN γ no leite materno pode possivelmente explicar a habilidade do leite em reduzir o risco de alergias (HOFSTRA et al., 1998).

Os oligossacarídeos presentes no leite embora não possuam valor nutritivo para o lactente, exercem função como prebióticos, que aumentam seletivamente o crescimento de bactérias benéficas da microbiota do lactente (BALLARD; MORROW, 2013). A maioria das bactérias entéricas patogênicas usam os glicanos de superfície para identificar e ligar-se às células alvo, como primeiro passo da patogênese. Dessa maneira, oligossacarídeos presentes no leite podem inibir por competição a habilidade dos patógenos em ligar-se aos receptores no intestino, protegendo desta maneira o lactente destes patógenos (NEWBURG; RUIZ-PALACIOS; MORROW, 2005). Por exemplo, um oligossacarídeo presente no leite materno humano foi capaz de inibir a aderência de *Campylobacter jejuni*, a causa mais comum de diarreia bacteriana, na mucosa intestinal (RUIZ-PALACIOS et al., 2003).

2.5.1.3 Diversidade bacteriana do leite materno e circulação enteromamária

Estudos recentes mostram que o colostro e leite de mulheres saudáveis contêm bactérias, incluindo *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, bactérias produtoras de ácido lático, *Propionibacterium*, e *Bifidobacterium* (FERNÁNDEZ L et al., 2013). Acreditava-se que qualquer bactéria encontrada no leite humano era resultado de contaminação da cavidade oral ou da pele da mãe (WEST; HEWITT; MURPHY, 1979). Algumas bactérias provenientes da cavidade oral infantil podem contaminar o leite devido ao refluxo de leite para os ductos mamários, porém este mecanismo não explica porque o pré-colostro secretado pela mulher antes do parto já contenha a microbiota que caracteriza o leite humano (MARTÍN et al., 2004). Apesar de partilhar alguns filotipos, quando compara-se as comunidades bacterianas detectadas no leite e aquelas encontradas na pele da mama, revela-se que existem grandes diferenças entre elas, como por exemplo a presença de *Bifidobacterium*, um gênero estritamente anaeróbico, improvável de ser encontrado em pele (GUEIMONDE et al., 2007; HUNT et al., 2011).

Recentes descobertas sugerem que bactérias selecionadas da microbiota gastrointestinal materna podem acessar locais além do trato gastrointestinal como, por exemplo, as glândulas mamárias, através de uma rota enterro-mamária (MARTÍN et al., 2004). Embora seja uma questão controversa, alguns estudos oferecem embasamento para tal translocação fisiológica. O mecanismo de translocação envolveria células dendríticas e células CD18+, que seriam capazes de capturar as bactérias não patogênicas do lúmen intestinal e, posteriormente, leva-las para outros locais, incluindo

a glândula mamária (FERNÁNDEZ L et al., 2013). Destaca-se ainda que existe um importante efluxo de células imunes intestinais para as glândulas mamárias durante o final da gravidez e lactação e que, de fato, a existência de uma circulação entero-mamária de células produtoras de IgA já é conhecida (NEWBOURG, 2005).

A glândula mamária prepara-se para a lactação através de diversos passos desde a adolescência e gravidez. Durante a gravidez, devido à influência hormonal, há um grande aumento de ductos e alvéolos. Ao final da gestação os lóbulos do sistema alveolar estão maximamente desenvolvidos e uma pequena quantidade de colostro pode ser liberada algumas semanas antes do parto. O aumento dos vasos linfáticos, o fornecimento de sangue e a ação miocontrátil da ocitocina nas glândulas mamárias também podem facilitar a presença de bactérias endógenas no leite. Essas mudanças de ambiente criam ótimas condições para a formação de biofilme na auréola e nos sistemas de ductos mamários e o estabelecimento dessa microbiota mamária específica e transiente (FERNÁNDEZ L et al., 2013).

As bactérias presentes no leite desempenham diversos papéis no trato gastrointestinal do recém-nascido. Elas podem contribuir para a redução da incidência e severidade das infecções que podem acometer o lactente por diferentes mecanismos, como exclusão por competição, produção de compostos antimicrobianos, melhora da barreira intestinal devido ao aumento da produção de mucina e a redução da permeabilidade (OLIVARES et al., 2006).

As bactérias presentes no leite também podem participar na correta maturação do sistema imune infantil desde que as cepas sejam capazes de modular as respostas imune tanto inata quanto adquirida por meio da produção de citocinas. Os microrganismos podem também contribuir para melhorar as funções intestinais como a digestão, através da quebra de açúcares e de proteínas, sendo esta possibilidade particularmente atrativa, levando-se em consideração o rápido transito intestinal e o maior pH estomacal dos lactentes em relação aos adultos, produção de metabólitos funcionais, como o butirato, que é a principal fonte de energia dos colonócitos e um relevante modulador da função intestinal (GIL-CAMPOS et al., 2012; MALDONADO et al., 2010).

2.6 A glândula mamária de murinos e suas modificações

O metabolismo durante a gestação está direcionado para o suprimento nutricional dos fetos e da glândula mamária (BELL, 1984). Estima-se que 60% do crescimento total da glândula mamária das ratas ocorre durante a gestação. Observa-se um acúmulo de lipídeos durante a primeira metade da gestação, e a utilização destes durante a segunda metade (ROSATO et al., 2002). Há um rápido e contínuo aumento do epitélio associado à redução do tecido adiposo durante a gestação. Os alvéolos aumentam em tamanho e número, até que, a glândula mamária seja quase que completamente constituída de epitélio (MASSO-WELCH et al., 2000). As células mioepiteliais, os vasos, dividem-se rapidamente no início da gestação, porém com o progresso da gestação a velocidade declina após o décimo dia (JOSHI et al., 1986).

Para a produção dos constituintes do leite, a morfogênese alveolar sofre diferenciações estruturais e funcionais durante a segunda metade da gestação (FRENCH et al., 1996). O epitélio alveolar se hipertrofia, devido ao acúmulo de lipídeos, vesículas e algumas organelas (JOSHI et al., 1986; MASSO-WELCH et al., 2000). No décimo nono dia de gestação, o epitélio alveolar praticamente alcança seu desenvolvimento máximo, com células alveolares repletas de lipídeos e os lúmens alveolares repletos de leite (MASSO-WELCH et al., 2000). As papilas mamárias crescem e se desenvolvem, ocorre o ingurgitamento dos vasos sanguíneos e modificações nos componentes da matriz extracelular do estroma (JOSHI et al., 1986; MASSO-WELCH et al., 2000).

Durante a lactação, a glândula mamária é um dos tecidos metabolicamente mais ativos, devido à síntese do leite. Os nutrientes mais requeridos são água, glicose, aminoácidos, ácidos graxos, cálcio e potássio (BELL, 1984). Durante a lactação, os lumens estão repletos de substâncias basofílicas e micelas de caseína em associação com glóbulos de gordura. Os alvéolos são heterogêneos quanto à distensão luminal e a espessura do epitélio. A morfologia glandular permanece similar durante todos os 21 dias de lactação em murinos. Devido à presença de lipídeos no citoplasma e vesículas secretoras contendo lactose, as células do epitélio alveolar apresentam uma aparência espongiforme (MASSO-WELCH et al., 2000).

Após 21 dias de lactação ocorre o desmame, ocasionando a involução da glândula mamária que se caracteriza pela perda de epitélio alveolar secretor. A cessação da amamentação tem sido atribuída a diversos fatores tais como: redução dos níveis de prolactina, isquemia, fatores presentes no leite que promovem a morte celular, entre outros. O processo de involução da glândula mamária apresenta duas fases,

primeiramente observa-se a apoptose dos elementos epiteliais das glândulas, resultando numa redução de 80% das células do epitélio lóbulo-alveolar. A segunda fase se dá quando a integridade alveolar já está comprometida e ocorre ativação do plasminogênio em plasmina, que resulta na degradação proteolítica da matriz extracelular, incluindo a membrana basal, devido ao aumento da atividade de proteases extracelulares (FURLONG et al., 1996; MASSO-WELCH et al., 2000).

2.7 Atividade galactagoga

A percepção da oferta insuficiente de leite é frequentemente citada como razão para cessação da amamentação em diversas populações em todo o mundo (WHO, 2011). Galactagogos (ou lactagogos) são medicamentos ou outras substâncias, que auxiliam na iniciação, manutenção ou aumento da produção de leite materno (LI et al., 2008). Alimentos, plantas medicinais e medicamentos são utilizados durante o período de amamentação como galactagogos. A utilização destas substâncias demanda cuidados devido à necessidade de realização de estudos bem delineados para avaliar sua eficácia e a segurança. (ZAPANTIS; STEINBERG; SCHILIT, 2012).

Poucos estudos são conclusivos sobre a efetividade dos probióticos para estes fins. A suplementação *Bacillus subtilis* na alimentação de ovelhas, aumentou a produção média diária de leite e os teores de gordura e proteína do leite (KRITAS et al., 2006). Estudos têm demonstrado que *B. subtilis* tem o potencial para aumentar o desempenho do crescimento de suínos (ALEXOPOULOS et al., 2004) e galinhas (FRITTS et al., 2000).

Um estudo demonstrou que o produto da fermentação do *B. subtilis natto* efetivamente aumentou o desempenho da lactação de vacas leiteiras em lactação precoce. A produção de leite foi aumentada e os componentes do leite foram melhorados por meio da elevação de gordura de leite, proteína e rendimento de lactose, como resultado da melhoria da fermentação no rúmen quando as vacas foram alimentadas com *B. subtilis natto* (SUN; WANG; DENG, 2013). Esta melhora da qualidade do leite é um efeito indireto do consumo de probióticos, o consumo deste leite rico em nutrientes é benéfico para o crescimento dos filhotes. Em animais monogástricos, acredita-se que os probióticos atuam no intestino ajudando na melhor utilização dos nutrientes, melhorando, assim, o peso corporal, condição e produção de leite (ALEXOPOULOS et al., 2004).

3. JUSTIFICATIVA

Os benefícios do aleitamento materno são inúmeros, podendo citar proteção contra doenças alérgicas, diarreicas, respiratórias, além de fornecer os nutrientes essenciais ao crescimento do lactente e garantir maior aproximação na relação mãe-filho (HENNET; BORSIG, 2016). O leite materno deve constituir a única fonte de hidratação e alimentação nos primeiros seis meses de vida, devendo continuar até os dois anos de idade mesmo com a inserção gradual da alimentação complementar (WHO, 2011).

A percepção da baixa produção de leite é uma das dificuldades mais frequentes na prática do aleitamento materno, segundo o relato das mães (LI et al., 2008), ou seja, a hipogalactia é uma das razões primordiais que levam ao desmame precoce.

Diante do contexto e da importância dos galactagogos e probióticos para saúde, o projeto tem como objetivo avaliar o potencial probiótico do *Lactobacillus plantarum* Lp62 quanto à possível atividade galactogoga, alteração na composição química e imunológica do leite e ganho de peso da ninhada em modelo experimental animal.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade galactogoga, influência sobre a composição do leite materno e crescimento de filhotes de ratas suplementadas com microrganismo probiótico *Lactobacillus plantarum* Lp62 isolado da fermentação de amêndoas de cacau.

4.2 Objetivos específicos

Avaliar a atividade galactogoga do microrganismo probiótico *Lactobacillus plantarum* Lp62 isolado da fermentação de amêndoas de cacau;

Avaliar a influência do microrganismo probiótico *Lactobacillus plantarum* Lp62 na composição bioquímica do leite;

Avaliar a influência do microrganismo probiótico *Lactobacillus plantarum* Lp62 na composição imunológica do leite;

Avaliar a influência do microrganismo probiótico *Lactobacillus plantarum* Lp62 sobre a morfologia histológica das glândulas mamárias;

Avaliar a influência do microrganismo probiótico *Lactobacillus plantarum* Lp62 no ganho de pesos de filhotes em modelo experimental animal.

5. METODOLOGIA

5.1 Microrganismo

A cepa *L. plantarum* foi isolada a partir da fermentação de um lote de grãos de cacau da região de Ilhéus-Itabuna/BA e foi identificada por sequenciamento do gene 16S rRNA (número de acesso ao GenBank KU291427). As bactérias foram reativadas por crescimento em MRS caldo, à 37°C, 5% de CO₂ por 48h e plaqueadas em MRS ágar para verificação da pureza do repique.

Realizou-se uma curva de crescimento do *L. plantarum* em um sistema fechado com incubação em meio MRS líquido, a 37°C e 5% de CO₂. A curva de crescimento microbiano foi determinada por espectrofotometria (Absorbância: 630 nm) e a contagem de células viáveis foram determinadas por diluições seriadas e espalhamento em meio MRS ágar a cada hora. Após realização da curva, o tempo de 12 horas de crescimento foi o ideal para obter 10⁹ UFC/mL de suspensão. As bactérias foram inoculadas diariamente em MRS caldo, à 37°C por 12 horas e administradas ao grupo tratamento por gavagem.

5.2 Animais

Para todos os experimentos seguintes, ratas fêmeas Wistar (250-300 g) foram mantidas no biotério do Instituto Multidisciplinar em Saúde e mantidas no ciclo claro-escuro 12 horas (luzes acessas das 6 às 18 horas), a temperatura de 23 ± 2°C e a umidade relativa de 50 ± 2%. Os animais foram mantidos individualmente em caixas de polipropileno contendo maravalha na base da caixa, isoladas de machos, e foi permitido livre acesso à comida e água.

Inicialmente, antes do cruzamento, foi realizada a determinação do ciclo estral através do lavado vaginal de todas as ratas. 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. Para a realização dos experimentos em modelo animal, este projeto foi aprovado no Comitê de Ética de Experimentação Animal do Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia, Campus Anísio Teixeira, nº do protocolo 035/2015.

5.3 Avaliação do peso da ninhada e a atividade galactagoga do microrganismo probiótico

Dezesseis ratas prenhas foram divididas em dois grupos experimentais, sendo que o grupo 1 (n=8) recebeu 0,2 ml de solução salina 0,9% e o grupo 2 (n=8) recebeu 0,2 ml suspensão bacteriana do microrganismo probiótico com $7,2 \times 10^9$ UFC/mL (dose recebida $1,44 \times 10^9$ UFC/0,2 mL). Todos os animais foram tratados diariamente às 19h por gavagem com a solução salina 0,9% ou com suspensão bacteriana sete dias antes da data provável do parto e durante 19 dias de lactação (Figura 1). Após o parto, o número de filhotes foi ajustado de maneira que cada rata lactante permaneceu com oito filhotes, sendo quatro machos e quatro fêmeas.



Figura 1: Esquema de tratamento das ratas. O tratamento dos grupos iniciou-se sete dias antes da provável data do parto e foi continuado durante 19 dias da lactação. O grupo teste recebeu 0,2 mL da suspensão com $7,2 \times 10^9$ UFC/mL do microrganismo e o grupo controle recebeu 0,2 mL de solução salina por gavagem diariamente. As ratas foram eutanasiadas ao 20º dia do experimento.

As ratas lactantes e os filhotes foram pesados no 4º, 7º, 10º, 13º, 16º e no 18º dia de vida dos filhotes, usando uma balança eletrônica analítica de precisão. Nesses dias, os filhotes foram pesados às 12h (P1) e subsequentemente isolados de suas mães por 4 horas, entre 12h e 16h, e pesados novamente às 16h (P2). Logo após, os filhotes retornaram para suas mães sendo permitida a amamentação por uma hora. Durante a amamentação, nas três últimas pesagens, foi observado o comportamento das mães, como a presença de piloereção, alteração da atividade locomotora, diarreia, postura de amamentação, organização e manutenção do ninho, recolher e lamber filhotes e morte.

Às 17h, novamente os filhotes foram pesados (P3) e retornaram para suas mães até a próxima pesagem. As mães foram pesadas nos mesmos dias que os filhotes às 16h e 17h.

A produção de leite durante o período de 1 hora de amamentação foi estimada por meio da diferença do peso dos filhotes das 17h (P3) e 16h (P2), sendo que este valor foi corrigido pela perda de peso metabólica dos filhotes devido aos processos, como respiração, defecação e perda urinária (Figura 2).

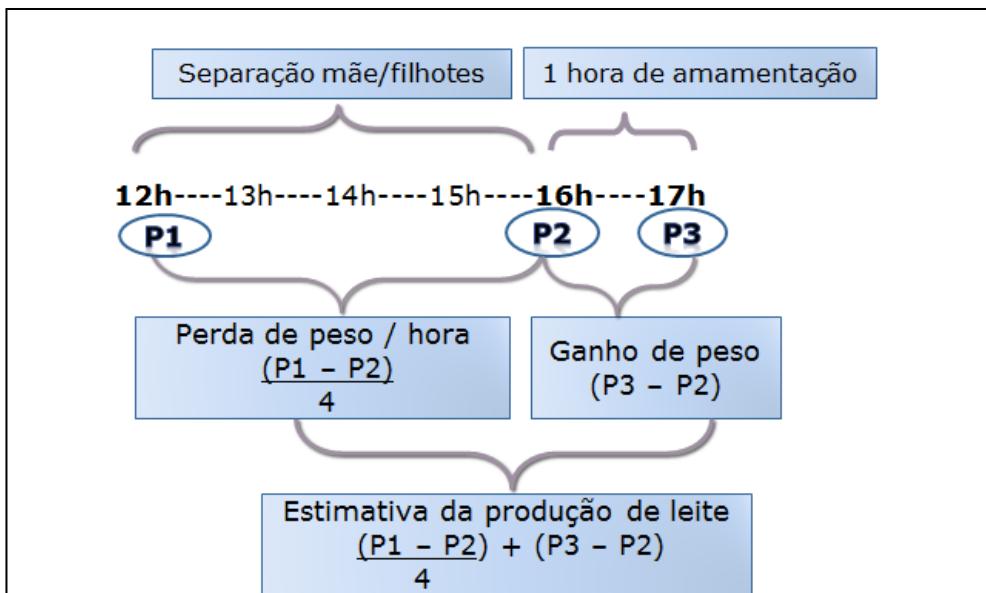


Figura 2: Estimativa da produção de leite em 1 hora.

O ganho de peso diário dos filhotes foi calculado pela diferença de peso entre os pesos obtidos por P1, dividido pelo número de dias entre os intervalos de pesagens. O ganho de peso total durante todo o experimento foi calculado por P3 do 18º dia menos P1 do 4º dia de vida dos filhotes. No 20º dia as ratas foram anestesiadas com quetamina (75 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg), sendo decaptadas posteriormente. Três pares de glândulas mamárias (1ª inguinal, 1ª abdominal e 3ª torácica) foram dessecados e removidos para a análise histológica das glândulas.

5.4 Análise da composição bioquímica do leite das ratas tratadas com microrganismo probiótico

No décimo segundo e décimo nono dia, a coleta de leite foi realizada para análise da composição bioquímica. Antes de se iniciar a coleta, as ratas lactantes foram separadas dos filhotes por duas horas, após este período, os filhotes retornaram para suas mães e amamentaram por trinta minutos. As ratas lactantes da etapa anterior foram

anestesiadas com a mistura de quetamina (75 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg), por injeção intraperitoneal.

A ocitocina (0,5 UI / rata, Syntocinon® Sandoz, Brazil) foi injetada via intraperitoneal para estimular o fluxo de leite. As amostras de leite foram obtidas por compressão manual das mamas das ratas. Gotas foram coletadas com auxílio de micropipetas e esvaziadas em tubos eppendorf de polipropileno e mantidas a - 80°C até a análise dos constituintes do leite.

O tempo de coleta do leite para cada rata lactante foi de aproximadamente 30 minutos. A ordenha de leite ocorreu sempre entre 13-15h, para minimizar possíveis variações diurnas na composição do leite (GRIGOR; POCZWA; ARTHUR, 1986). Assim, foram dosados os níveis de proteínas totais, triglicerídeos, colesterol e lactose por método colorimétrico.

O leite da rata foi diluído na relação 1:5 para as dosagens de proteínas total e colesterol, 1:20 para a dosagem de triglicerídeos e 1:15 para as dosagens de lactose. As proteínas totais do leite foram quantificadas com o uso do kit comercial Labtest®, sendo expresso os resultados em g/L. Trata-se de um método colorimétrico de Biureto que se baseia na reação do reativo do biureto, que é constituído de uma mistura de cobre e hidróxido de sódio com um complexante que estabiliza o cobre em solução. O íon cobre em meio alcalino (reagente de biureto) reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando cor púrpura, que tem absorbância máxima em 545 nm, proporcional à concentração das proteínas na amostra. Apesar deste método não ser muito sensível, continua sendo recomendado para a determinação da concentração de proteínas totais no leite quando comparado com outros métodos (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998).

Os triglicerídeos foram quantificados por método colorimétrico usando o kit comercial da Labtest®, expresso os resultados em g/L. Trata-se de um método colorimétrico baseado na reação de Trinder onde os triglicérides são hidrolisados pela lipase lipoprotéica e o glicerol liberado é fosforilado pela glicerolquinase formando glicerolfosfato que é oxidado a dihidroxiacetona e água oxigenada por ação da glicerol-3-fosfato oxidase. Através de reação de copulação oxidativa catalisada pela peroxidase, a água oxigenada reage com o a 4-aminoantipirina (4-AMP) e 4-clorofenol, produzindo a quinoneimina de cor vermelha. A absorbância do complexo medida em 505 nm é diretamente proporcional à concentração de triglicérides (TRINDER, 1969).

O colesterol foi quantificado por método colorimétrico utilizando kit comercial Labtest, e os resultados expressos em g/L. De acordo com o método, os ésteres de

colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimina que tem absorvividade máxima em 500 nm (ALLAIN et al., 1974).

Por fim o teor de lactose foi determinado usando o método colorimétrico baseado na reação com ácido pícrico (COSTA; DOREA, 1992; PENHA-SILVA et al., 2004). As concentrações de lactose das amostras de leite foram determinadas pela equação de regressão da reta padrão de lactose.

5.5 Análise histológica das glândulas mamárias

Três pares de glândulas mamárias das ratas lactantes do grupo controle (solução salina) e grupo probiótico, foram removidos e fixados imediatamente na solução a 10% de formalina neutra tamponada. Após a fixação, os espécimes foram desidratados por meio de imersão numa série de soluções de etanol e xileno em concentrações graduais e crescentes, sendo posteriormente embebidos na parafina e realizados secções de 5 µm no bloco de parafina. Posteriormente, foi realizada a coloração com hematoxilina e eosina das lâminas.

Para o estudo histológico e morfométrico, fez-se a captura e digitalização de imagens das lâminas no formato TIFF, usando um microscópio binocular de luz Olympus® BX-51 acoplado a uma câmera digital de captura Olympus SC30 – 3.3 megapixels CMOS, por meio do programa analySISgetIT. Uma lâmina de cada glândula foi feita, e de cada lâmina foram captadas dez imagens de dez campos aleatórios, sendo escolhidos por sistema de varredura, a partir de cada uma das três zonas localizadas ao longo de um caminho imaginário orientado num eixo vertical, a partir do centro do mamilo para a margem esquerda e direita do tecido parenquimatoso adjacente. Foram escolhidos dez campos para cada aumento (4x, 10x e 40x), totalizando 30 imagens por lâmina/glândula para análise. A análise histológica e morfométrica foi feita com o auxílio do programa ImageJ 1.46r. Estruturas das glândulas mamárias foram identificadas e realizada a quantificação manual com o auxílio da ferramenta ROI Manager do número de lóbulos, alvéolos, ductos e vasos sanguíneos por glândula (10 fotos /campos).

Realizou-se a relação alvéolos-ducto de cada glândula. Para determinar a diferença citológica das células epiteliais alveolares secretoras, as células foram

classificadas de acordo com o grau de diferenciação: Totalmente diferenciada (G3) – muitos vacúolos, núcleo redondo localizado na região basal, citoplasma abundante em relação ao núcleo, gotículas de gordura na região apical; diferenciação intermediária (G2) – média quantidade de vacúolos, formato do núcleo mais irregular e maior proporção nuclear do que citoplasmática; pouca diferenciação (G1) – poucos ou nenhum vacúolo, poucas e grandes gotículas de gordura espalhadas pela célula e área relativamente pequena de citoplasma. Além disso, também foram classificadas como involução quando observado a presença de células apoptóticas no epitélio ou no lúmen dos alvéolos (AKERS; CAPUCO; KEYS, 2006).

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism (versão 5.0) e apresentados como média \pm erro padrão da média. Para analisar a normalidade dos dados recorreu-se ao teste Shapiro-Wilk. As variáveis que apresentaram distribuição não normal e homogeneidade de variância foi utilizado o teste de Mann Whitney. Para as variáveis que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância foi utilizado o teste t não pareado ou ANOVA one-way e post-hoc de Tukey HSD quando apropriado. O nível de significância adotado foi de 5%.

7. REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSSON, T. R. et al. Probiotics in prevention of IgE-associated eczema: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **J Allergy Clin Immun**, v. 119, p. 1174–1180, 2007.
- 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.
- AHRNÉ, S. et al. The normal Lactobacillus flora of healthy human rectal and oral mucosa. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, n. 1, p. 88–94, 1998.
- AKERS, R. M.; CAPUCO, A. V.; KEYS, J. E. Mammary histology and alveolar cell differentiation during late gestation and early lactation in mammary tissue of beef and dairy heifers. **Livestock Science**, v. 105, n. 1–3, p. 44–49, 2006.
- ALANDER, M. et al. The effect of probiotic strains on the microbiota of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME). **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 71–79, 1999.
- ALEXOPOULOS, C. et al. 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.**, v. 88, p. 381–392, 2004.
- ALLAIN, C. C. et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical chemistry**, v. 20, n. 4, p. 470–475, abr. 1974.
- ARDISSONE, A. N. et al. Meconium Microbiome Analysis Identifies Bacteria Correlated with Premature Birth. **PLOS ONE**, v. 9, n. 3, p. e90784, 10 mar. 2014.
- BALLARD, O.; MORROW, A. L. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. **Pediatric clinics of North America**, v. 60, n. 1, p. 49–74, fev. 2013.
- BELL, J. M. Nutrients and toxicants in rapeseed meal: a review. **Journal of animal science**, v. 58, n. 4, p. 996–1010, abr. 1984.
- BENGMARK, S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. **Gut**, v. 42, n. 1, p. 2–7, 1998.
- BENGMARK, S.; GIL, A. Bioecological and nutritional control of disease: prebiotics, probiotics and synbiotics. **Nutr Hosp**, v. 21, n. 2, p. 72–84, 2006.
- BOTTCHER, M. F. et al. Cytokines in breast milk from allergic and nonallergic mothers. **Pediatric research**, v. 47, n. 1, p. 157–162, jan. 2000.
- BRAEGGER, C. et al. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition.

Journal of pediatric gastroenterology and nutrition, v. 52, n. 2, p. 238–250, fev. 2011.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 50, p. 131–149, 1999.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: A literature survey. **Crit. Rev. Microbiol.**, n. 28, p. 281–370, 2002.

CHATTHA, K. S. et al. Probiotics and colostrum/milk differentially affect neonatal humoral immune responses to oral rotavirus vaccine. **Vaccine**, 2013.

CHIANG, S. S.; PAN, T. M. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 903–916, 2012.

CLAES, I. J. J. et al. Lessons from probiotic-host interaction studies in murine models of experimental colitis. **Molecular nutrition & food research**, v. 55, n. 10, p. 1441–53, 2011.

COSTA, T. H.; DOREA, J. G. Concentration of fat, protein, lactose and energy in milk of mothers using hormonal contraceptives. **Annals of tropical paediatrics**, v. 12, n. 2, p. 203–209, 1992.

DE VRESE, M.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 111, p. 1–66, 2008.

DE VRIES, M. C. et al. *Lactobacillus plantarum*-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 1018–1028, 2006.

DIYA, A. et al. Safety of the Probiotic Strain *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (= strain 299v) in an Endocarditis Animal Model. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 14, p. 50–53, 2002.

DROUAULT-HOLLOWACZ, S. et al. Anti-inflammatory potential of the probiotic dietary supplement lactibiane tolerance: in vitro and in vivo considerations. **Clin. Nutr.**, v. 25, p. 994–1003, 2006.

FALK, P. G. et al. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 62, n. 4, p. 1157–70, 1998.

FAO/WHO. Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. **Expert Consultation Report: Córdoba, Argentina: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization**, p. 1–4, 2001.

FERNÁNDEZ, L. et al. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. **Pharmacological Research**, v. 69, n. 1, p. 1–10, 2013.

FERNÁNDEZ L et al. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. **Pharmacol Res**, v. 69, p. 1–10, 2013.

FERREIRA, F. H. et al. Microbiota indígena do trato gastrintestinal Normal microbiota of gastrointestinal tract. **Revista De Biologia E Ciencias Da Terra**, v. 10, n. 1, p. 78–93, 2010.

FRENCH, L. E. et al. Modulation of clusterin gene expression in the rat mammary gland during pregnancy, lactation, and involution. **Biology of reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1213–1220, 1996.

FRITTS, C. A. et al. Bacillus subtilis C-3102 (Calsporin) improves live performance and microbial status of broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 9, p. 149–155, 2000.

FURLONG, E. E. M. et al. Expression of a 74-kDa Nuclear Factor 1 (NF1) Protein Is Induced in Mouse Mammary Gland Involution. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 47, p. 29688–29697, 1996.

GAROFALO, R. Cytokines in Human Milk. **The Journal of pediatrics**, v. 156, 2010.

GIL-CAMPOS, M. et al. Lactobacillus fermentum CECT 5716 is safe and well tolerated in infants of 1-6 months of age: a randomized controlled trial. **Pharmacological Research**, v. 65, p. 231–8, 2012.

GR??NLUND, M. et al. Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the bifidobacterium microbiota in infants at risk of allergic disease. **Pediatriya**, v. 52, n. 3, p. 57–63, 2012.

GRIGOR, M. R.; POCZWA, Z.; ARTHUR, P. G. Milk lipid synthesis and secretion during milk stasis in the rat. **The Journal of nutrition**, v. 116, n. 9, p. 1789–1797, set. 1986.

GUARNER, F. et al. Probióticos e prebióticos. **World Gastroenterology Organisation Practice Guidelines**, p. 1–29, 2011.

GUEIMONDE, M. et al. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? **Neonatology**, v. 92, p. 64–6, 2007.

HARTY, D. W. S. et al. Pathogenic potential of lactobacilli. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, n. 1–2, p. 179–189, 1994.

HENNET, T.; BORSIG, L. Breastfed at Tiffany â€TM s. **Trends in Biochemical Sciences**, v. xx, p. 1–11, 2016.

HOFSTRA, C. L. et al. Differential effects of endogenous and exogenous interferon-gamma on immunoglobulin E, cellular infiltration, and airway responsiveness in a murine model of allergic asthma. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 19, n. 5, p. 826–835, nov. 1998.

HUANG, J. et al. The effects of probiotics supplementation timing on an ovalbumin-sensitized rat model. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 132–141, 2010.

HUNT, K. et al. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. **PLoS ONE**, v. 6, 2011.

HURLEY, W. L.; THEIL, P. K. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. **Nutrients**, v. 3, n. 4, p. 442–474, 2011.

JARVINEN, K.-M.; SUOMALAINEN, H. Leucocytes in human milk and lymphocyte subsets in cow's milk-allergic infants. **Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology**, v. 13, n. 4, p. 243–254, ago. 2002.

JIMENEZ, E. et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. **Current microbiology**, v. 51, n. 4, p. 270–274, out. 2005.

JIMENEZ, E. et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? **Research in microbiology**, v. 159, n. 3, p. 187–193, abr. 2008.

JOSHI, K. et al. Cellular proliferation in the rat mammary gland during pregnancy and lactation. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 54, n. 1, p. 52—61, 1986.

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. **The British journal of nutrition**, v. 106, n. 6, p. 887–895, 2011.

KEEN, C. L. et al. Developmental changes in composition of rat milk: trace elements, minerals, protein, carbohydrate and fat. **The Journal of nutrition**, v. 111, n. 2, p. 226–236, 1981.

KLEESSEN, B.; BEZIRTOGLOU, E.; MATTO, J. Culture-based knowledge on biodiversity development and stability of human gastrointestinal microflora. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. Suupl 2, p. 53–63, 2000.

KRITAS, S. K. et al. Effect of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* supplementation of ewe's feed on sheep milk production and young lamb mortality. **Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine**, v. 53, n. 4, p. 170–173, 2006.

KRUIS, W. et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. **Gut**, v. 53, p. 1617–1623, 2004.

LI, R. et al. Why mothers stop breastfeeding: mothers' self-reported reasons for stopping during the first year. **Pediatrics**, v. 122 Suppl, p. S69-76, out. 2008.

LÖNNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **The american journal of clinical nutrition**, v. 77, p. 1537S–43S, 2003.

MALDONADO, J. et al. Safety and tolerance of the human milk probiotic strain Lactobacillus salivarius CECT5713 in 6-month-old children. **Nutrition**, v. 26, p. 1082–87, 2010.

MANZONI, P. et al. Bovine lactoferrin supplementation for prevention of late-onset sepsis in very low-birth-weight neonates: a randomized trial. **JAMA**, v. 302, n. 13, p. 1421–1428, out. 2009.

MARTEAU, P. Safety aspects of probiotic products. **Scand J Nutr**, 2002.

MARTÍN, R. et al. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. **Trends Food Sci Technol**, v. 15, p. 121–7, 2004.

MASSO-WELCH, P. A. et al. A developmental atlas of rat mammary gland histology. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 5, n. 2, p. 165–185, abr. 2000.

MILLION, M. et al. Comparative meta-analysis of the effect of Lactobacillus species on weight gain in humans and animals. **Microbial pathogenesis**, v. 53, n. 2, p. 100–108, ago. 2012.

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

NEWBURG, D. S. Innate immunity and human milk. **The Journal of nutrition**, v. 135, n. 5, p. 1308–1312, maio 2005.

NEWBURG, D. S.; RUIZ-PALACIOS, G. M.; MORROW, A. L. Human Milk Glycans Protect Infants Against Enteric Pathogens. **Annual Review of Nutrition**, v. 25, n. 1, p. 37–58, 2005.

NG, S. et al. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. **Inflamm Bowel Dis**, v. 15, n. 2, p. 300–10, 2009.

NGUYEN, T. D. T.; KANG, J. H.; LEE, M. S. Characterization of Lactobacillus plantarum PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, n. 3, p. 358–361, 2007.

NICHOLS, R. L.; SMITH, J W. Anaerobes from a surgical perspective. **Clinical Infectious Diseases**, n. 18, p. 280–286, 1994.

NICOLI, J. R. Normal gastrointestinal microbiota in domestic animals and human beings. **Enferm. Infec. Microbiol**, v. 15, p. 183–190, 1995.

NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q. Microbiota gastrointestinal normal na doença e na saúde. In: **Gastroenterologia**. Rio de Janeiro: Médica e Científica Ltda, 2004. p. 1037–1047.

OLIVARES, M. et al. Antimicrobial potential of four Lactobacillus strains isolated from breast milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 72–9, 2006.

OUWEHAND, A.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, S. The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood. **Eur. J. Nutr.**, v. 41, p. 132–137, 2002.

PENHA-SILVA, N. et al. Determinação rápida de açúcares redutores com ácido pírico para uso biotecnológico. **Biosci J**, v. 20, p. 183–8, 2004.

PROKESOVA, L. et al. Cytokine levels in healthy and allergic mothers and their children during the first year of life. **Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology**, v. 17, n. 3, p. 175–183, maio 2006.

RAUCH, M.; LYNCH, S. V. Probiotic manipulation of the gastrointestinal microbiota. **Gut Microbes**, v. 1, p. 335–338, 2010.

REMBACKEN, B. et al. Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. **Lancet**, v. 354, p. 635–639, 1999.

RIOUX, K. P.; MADSEN, K. L.; FEDORAK, R. N. The role of enteric microflora in inflammatory bowel disease: human and animal studies with probiotics and prebiotics. **Gastroenterology clinics of North America**, v. 34, n. 3, p. 465–82, ix, set. 2005.

ROSATO, R. et al. Effect of chronic thyroxine treatment on IGF-I, IGF-II and IGF-binding protein expression in mammary gland and liver during pregnancy and early lactation in rats. **European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 146, n. 5, p. 729–739, maio 2002.

ROTINI, V. O.; DUERDEN, B. I. The development of the bacterial flora in normal neonates. **Journal of medical microbiology**, v. 14, n. 1, p. 51–62, fev. 1981.

RUIZ-PALACIOS, G. M. et al. Campylobacter jejuni binds intestinal H(O) antigen (Fuc alpha 1, 2Gal beta 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 16, p. 14112–14120, abr. 2003.

SATOKARI, R. et al. Bifidobacterium and Lactobacillus DNA in the human placenta. **Letters in applied microbiology**, v. 48, n. 1, p. 8–12, jan. 2009.

SCHABUSSOVA, I. et al. Distinctive anti-allergy properties of two probiotic bacterial strains in a mouse model of allergic poly-sensitization. **Vaccine**, v. 29, p. 1981–1900, 2011.

SCHULTZ, M. et al. Preventive effects of Escherichia coli strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 11, p. 372–378, 2004.

SILVA, V. D. O. et al. Effect of Probiotic Administration on the Immune Response: A Systematic Review of Experimental Models in Rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. October, p. 685–694, 2012.

SUN, P.; WANG, J. Q.; DENG, L. F. Effects of *Bacillus subtilis natto* on milk production, rumen fermentation and ruminal microbiome of dairy cows. **Animal : an international journal of animal bioscience**, v. 7, n. 2, p. 216–222, fev. 2013.

SUZUKI, Y. A.; SHIN, K.; LONNERDAL, B. Molecular cloning and functional expression of a human intestinal lactoferrin receptor. **Biochemistry**, v. 40, n. 51, p. 15771–15779, dez. 2001.

TAVERNITI, V.; GUGLIELMETTI, S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: Proposal of paraprobiotic concept). **Genes and Nutrition**, v. 6, n. 3, p. 261–274, 2011.

TRINDER, P. Determination of Glucose in Blood using Glucose Oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Ann. din. Biochem**, v. 6, p. 24–27, 1969.

WEID, T. VON DER; BULLIARD, C.; SCHIFFRIN, E J. Induction by a lactic acid bacterium of a population of CD4(+) T cells with low proliferative capacity that produce transforming growth factor beta and interleukin-10. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 8, p. 695–701, 2001.

WEST, P.; HEWITT, J.; MURPHY, O. The influence of methods of collection and storage on the bacteriology of human milk. **The influence of methods of collection and storage on the bacteriology of human milk**, v. 46, p. 269–77, 1979.

WHO. Infant and young child feeding. **World Health**, v. 155, n. May, p. 1–112, 2011.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787–793, nov. 1998.

ZAPANTIS, A.; STEINBERG, J. G.; SCHILIT, L. Use of Herbals as Galactagogues. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 25, p. 222–231, 2012.

Supplementation with *Lactobacillus plantarum* Lp62 to dam rats before delivery and during lactation affects milk cytokine profile and composition and body weight of pups.

Gladistone C. Messias¹, Patrícia Prado Santos¹, Ana Marta Novais Rocha¹, Beatriz Manuela Silva Santos¹, Ana Marques Botelho¹, Dhaísa Cristhina Alves Silva¹, Erika Santos Porto¹, Erika P. de Souza¹, Marina Lima dos Anjos¹, Rayra Almeida Sousa¹, Mara Viana Silva¹, Thainara Barros da Rocha¹, Aracely V. Melo¹, Manoela R. T. Carneiro¹, Mariluze P. Cruz¹, Lucas M. Marques¹, Ana Paula Uetanabaro², Gabriel Vinderola³, Regiane Yatsuda¹

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

2 Department of Biology and Biotechnology of Microorganisms, State University of Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, Brazil.

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

Corresponding author: Regiane Yatsuda

E-mail: reyatsuda@yahoo.com

Abstract

Purpose The *Lactobacillus plantarum* Lp62 is a lactic acid bacteria that have been isolated from cocoa beans and exhibit probiotic potential. Thus, it was determinate the influence of oral supplementation of *L. plantarum* Lp62 on the growth of rat's pups; on yield, cytokines and milk composition.

Methods *L. plantarum* Lp62 was administered daily by gavage in Wistar rats (N=8), from the 7th day before delivery and for 20 days during lactation, in a concentration of 7.2×10^9 CFU/mL. The dam and pups were weighed and milk was collected at 12nd and 19th day for determination of protein, triglycerides, cholesterol and lactose by colorimetric assays. IL-10 and TNF- α milk levels was analyzed by ELISA. The mammary glands of rats were removed for histological analysis.

Results Supplementation with *L. plantarum* showed significant higher weight of pups ($p < 0.05$), with no differences in the weight of dams ($p > 0.05$). The milk yield was not altered by *L. plantarum* treatment, but the composition of protein, triglycerides and cholesterol were increased ($p < 0.05$), without difference in lactose concentration ($p > 0.05$). The glands in involution stage showed no difference in the structures between treatments. TNF- α were lower in the milk of *L. plantarum* treatment ($p < 0.05$), without differences in the levels of IL-10 ($p > 0.05$).

Conclusions The treatment of dams during pregnancy and lactation with *L. plantarum* Lp62 showed increased in nutritional content and decrease of TNF- α on the milk, probably contributing to the higher weight of the pups.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, probiotic, immunology, rats, milk

Introduction

Probiotics are defined as living microorganisms which, when administered in adequate quantities, confer a health benefit on the host [1]. The beneficial effects of these microorganisms

are directly and exclusively related to the type of the strain used [2]. Probiotics have a commensal behavior, compete with the pathogens for nutrients in the large intestine and, by the barrier effect, adhere to the mucosa, preventing colonization by potentially pathogenic microorganisms. Probiotics may also interact with epithelial cells and exert an effect on the cells of the intestinal immune system, reducing the production of proinflammatory cytokines and increasing the production of anti-inflammatory cytokines. Thus, in the predominant condition in the intestine, they equilibrate the microbiota and protect the host [3].

Lactic acid bacteria (LAB) constitute a diverse group of Gram-positive, catalase-negative bacteria producing lactic acid as the main end-product of carbohydrate fermentation. *Lactobacillus* genus is certainly the main and diverse LAB group [4]. *Lactobacillus plantarum* is found in dairy products [5, 6], vegetables [7, 8], meat [9], silage [10], wine [11], gastrointestinal, vaginal, and urogenital tracts [12, 13], which denotes the amazing capabilities of adaptation and metabolic pathway diversities [14]. The health claims of *L. plantarum* permitted to develop different probiotic formulations [15]. *L. plantarum* LP62 is obtained from the fermentation of cocoa beans (*Theobroma cacao*), the main raw material in the manufacture of chocolate, important strain in the search for new bacteria for probiotic applications.

According to the World Health Organization (WHO), breastfeeding is the best way to provide ideal nutrition for newborn health. This is due to the abiotic composition of human milk constituted of well-balanced levels of all nutrients necessary for growth, as well as by protective substances such as immunoglobulins, lactoferrin, and lysozyme [16]. Part of this protection is probably also due to the influence that maternal milk has on the composition of the newborn's intestinal microbiota [17]. Bacteria of the maternal gastrointestinal microbiota can access the mammary glands through an entero-mammary pathway. Many transient anatomic and physiologic changes occur during pregnancy and lactation to provide a suitable framework for the development of the fetus first, and the neonate later. Interestingly, such adaptations may favor an increased bacterial translocation during late pregnancy and early lactation [18]. Interestingly, these bacteria are present in maternal milk in sufficient population levels to allow the colonization of the newborn intestine after its ingestion, but not to induce an inflammatory response in the mammary glands [19]. Furthermore, cytokines and other immunoregulatory factors, modulated by probiotic supplementation, might have a key role in the establishment of the microbiota of human milk [20]. For this reason, breastfeeding is nutritional, immunologically and microbiologically essential for newborn health [19].

In this context, the aim of this study was to evaluate the influence of oral administration of *Lactobacillus plantarum* Lp62 in dams during last week of pregnancy and during the lactation in relation to the possible galactagogue activity, alteration in the nutritional and cytokines composition of the milk and gain of weight of the litter/dams in experimental animal model.

Furthermore, this is the first report of oral supplementation of *L. plantarum* Lp62 in pregnant and lactate rats, evaluating the effects on the weight of pups, nutritional and immunological composition of milk.

Materials and Methods

Microorganism

L. plantarum Lp62 strain were isolated from the fermentation of cocoa beans and identified by 16S rRNA gene sequencing (GenBank access number KU291427) [21] and it was donated by the microbial biotechnology laboratory of State University of Santa Cruz (UESC). The *L. plantarum* were grown in MRS medium at 37°C, 5% CO₂ for 48h and plated on MRS. A growth curve of *L. plantarum* was performed in a closed system with incubation in MRS medium 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 solid MRS medium. The optimal number of colony forming units for *L. plantarum* is 10⁹ CFU/mL [22], and was obtained after 12 hours of growth. Bacteria were inoculated daily in MRS medium after *L. plantarum* growth at 37°C and 5% CO₂, for 12 hours and given to the treatment group.

Animals

Female Wistar rats (250-300 g) were obtained and maintained at our Animal Facility at the Multidisciplinary Health Institute of the 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 estrous cycle was determined by vaginal lavage of all female rats. Vaginal fluid was collected with a plastic pipette containing one drop of saline which was injected, aspirated and placed on the slide for microscopic viewing on the 10 and 40x objective. The females were housed for breeding after identifying the proestrus or estrous phase. The experiments were started around the 14th day of gestation. Animal care and research protocols were in accordance with the principles and guidelines adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and were approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Federal University of Bahia, with protocol number 035/2015.

Evaluation of galactagogue activity and the influence of *L. plantarum* on the pups growth

Sixteen pregnant rats were divided into two experimental groups, and group 1 (n = 8) received 0.2 ml of saline solution and group 2 (n = 8) received 0.2 ml bacterial suspension of the probiotic microorganism at 7.2 x 10⁹ CFU/mL. All pregnant rats were treated daily by gavage for seven days before the expected date of delivery and for 20 days of lactation. After delivery, the number of pups was adjusted, being four males and four females with similar weight for each lactating rats. The lactating rats and pups were weighed at the 4, 7, 10, 13, 16 and 18 day of lactation using a precision analytical electronic balance. During the experiment, the pups were weighed at 12h (P1) and subsequently isolated from their mothers for 4 hours, between 12h and 16h, and weighed again at 16h (P2). Soon after, the pups returned to their mothers

being allowed to breastfeed for one hour. The behavior of the mothers was observed. After one hour breastfeeding period, the pups were weighed (P3) and returned to their mothers until the next weighing. The mothers were weighed on the same days as the pups before and after breastfeeding period. The milk production during the 1 hour breastfeeding period was estimated by the difference in the weight of the pups from (P3) and (P2), and this value was corrected by the metabolic weight loss of the pups due to processes such as respiration, defecation and urinary loss following the formula: $\frac{P1 - P2}{4} + (P3 - P2)$. The daily weight gain of the pups was calculated by the difference in weight between the weights obtained by P1, divided by the number of days between the weighing intervals. The total weight gain during the whole experiment was calculated by P3 of the 18th day minus P1 of the 4th day of life of the pups. On the 20th day, the rats were anesthetized with ketamine (75 mg / kg) and xylazine (10 mg / kg), being subsequently decapitated. Three pairs of mammary glands (1st inguinal, 1st abdominal and 3rd thoracic) were desiccated and removed for the histological analysis of the glands.

Histological analysis of mammary glands

The mammary glands, cervical, abdominal and inguinal from each rat were removed and fixed immediately in the 10% neutral buffered formalin solution. After fixation, the glands were dehydrated by immersion in a series of ethanol and xylene solutions in gradient and increasing concentrations, then embedded in paraffin and sections of 5 μm were made in the paraffin block. Subsequently, the glands were stained with hematoxylin-eosin. For the histological and morphometric study, the images were captured and digitized from the slides in the TIFF format, using an Olympus® BX-51 binocular light microscope coupled to an Olympus SC30 digital capture camera - 3.3 megapixels CMOS, by AnalySISgetIT program. A slide of each gland was made, and from each slide ten images of ten random fields were chosen, being chosen by scanning system, from each of the three zones located along an imaginary path oriented on a vertical axis, from the center of the nipple to the left and right margin of the adjacent parenchymal tissue. Ten fields were selected for each power view (4x, 10x and 40x), totaling 30 images per slide/gland for analysis. Histological and morphometric analysis was done with the aid of ImageJ 1.46r program. Structures of the mammary glands were identified and the manual quantification with the aid of the ROI Manager tool was performed on the number of lobules, alveoli, ducts and blood vessels per gland. The alveoli-duct relation of each gland was performed. To determine the cytological difference of the secretory alveolar epithelial cells, the cells were classified according to degree of differentiation: Fully differentiated (G3) - many vacuoles, round nucleus located in the basal region, abundant cytoplasm relative to the nucleus, fat droplets in the Apical region; Intermediate differentiation (G2) - medium amount of vacuoles, more irregular nucleus shape and higher nuclear proportion than cytoplasmic; Poorly differentiation (G1) - few or no vacuoles, few large droplets of fat scattered throughout the cell and relatively small area of cytoplasm. In addition, they were also classified as involution when observed the presence of apoptotic cells in the epithelium or lumen of the alveoli [23].

Analysis of biochemical composition of milk of rats

On the twelfth and nineteenth day, the milk collection was performed to analyze the cytokine dosage and the biochemical composition. Prior to collection, the lactating rats were separated from the pups for two hours, after this period, the pups returned to their mothers and breastfed for thirty minutes. After breastfeeding, the lactating rats were anesthetized with ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) by intraperitoneal injection. Oxytocin (0.5 IU/ rat,

Syntocinon® Sandoz, Brazil) was injected intraperitoneally to stimulate milk flow. The milk samples were obtained by manual compression of the breasts of the rats. Drops were collected using micropipettes, stored in polypropylene Eppendorf tubes and kept at -80°C until analysis of milk constituents. The time of milk collection for each lactating rat was approximately 30 min. The milking always occurred between 13-15h, to minimize possible diurnal variations in milk composition [24]. Thus, the levels of total proteins, triglycerides, cholesterol and lactose were measured by colorimetric method [25, 26]. The milk was diluted 1:5 ratio for total protein and cholesterol dosages, 1:20 for the dosage of triglycerides and 1:15 for the dosages of lactose. The total milk proteins, triglycerides and cholesterol were quantified using the Labtest® commercial kit, the results expressed in g/L. Lactose content was determined using the colorimetric method based on the reaction with picric acid [27, 28]. The lactose concentrations of the milk samples were determined by the regression equation of the lactose standard line.

Analysis of TNF- α and IL-10 levels in milk of rats

An ELISA kit (Quantikine®, R&D systems®) and high-absorption 96-well microplates were used to quantify cytokines. After standardization of a curve and volume sample, 100 μ L of each serum was used to quantify cytokines IL-1 β and TNF- α . The immunoenzymatic reactions were measured by ELISA with a wavelength of 450 nm.

Statistical analysis

The data has been analyzed using GraphPad Prism software (version 5.0) and presented as mean \pm standard error of the mean. For variables that followed non-normal distribution and homogeneity of variance was used the Mann Whitney test. For variables that followed normal distribution and homogeneity of variance was used unpaired t-test or One-way ANOVA and Tukey HSD post-hoc comparisons when appropriate. The significance level was 5%.

Results

Evaluation of galactagogue activity and the influence of *L. plantarum* on the pups growth

The treatment of the dam with *L. plantarum* Lp62 did not appear to cause any adverse effects, such as diarrhea or behavioral changes, and all rats survived to the experimental treatment. The milk yield at the period of one hour was evaluated (Fig. 1), estimated by the weight gain of pups during one hour of breastfeeding, discounting metabolic losses. There was no difference in milk yield between *L. plantarum* Lp62 treated group and saline group ($p > 0.05$). The oral treatment with *L. plantarum* Lp62 increased the daily (Fig. 2) and total weight gain (Fig. 3) of the pups compared to the saline group ($p < 0.05$). The mean daily weight gain of the pups treated with *L. plantarum* Lp62 and saline was 1.36 ± 0.03 g and 1.26 ± 0.03 g, respectively. The mean of total weight gain of the pups treated with *L. plantarum* Lp62 was 19.78 ± 0.46 g, while the saline group obtained 17.17 ± 0.46 g. The dam lactating rats weight loss was estimated during one hour of breastfeeding (Fig. 4). All dam rats lost weight during lactation, but there was no significantly difference between *L. plantarum* Lp62 and saline treated group ($p > 0.05$). The mean of breastfeeding time during one hour of breastfeeding (Fig. 5) was 47.92 ± 1.67 for *L. plantarum* and 47.76 ± 1.4 minutes for saline. There was no significantly difference between *L. plantarum* Lp62 treated group and saline group ($p > 0.05$).

Histological analysis of mammary glands

In the histological analysis of the glands, the treatment with *L. plantarum* Lp62 did not alter significantly the number of ducts compared to the saline, 6.99 ± 0.25 for *L. plantarum* group and 6.67 ± 0.313 for saline group ($p > 0.05$) (Fig 6). There was no pronounced difference of number of lobules, 281.60 ± 12.02 for *L. plantarum* group and 273.50 ± 12.54 for saline group ($p > 0.05$) (Fig 7). There was no statistical difference of number of alveoli for *L. plantarum* (728.60 ± 35.91) and for saline group (737.80 ± 57.71) ($p > 0.05$) (Fig 8) and number of blood vessels 20.16 ± 2.03 for *L. plantarum* group and 19.93 ± 1.72 for saline group ($p > 0.05$) (Fig 9). According to the morphometric analysis of the alveolar cells (Table 1), it was observed that in the saline group, there was a greater number of cells in the involution stage (75.59 ± 11.15), followed by cells in poorly differentiated stage (23.82 ± 10.76) ($p < 0.05$), followed by the percentage of cells in the intermediate stage (0.58 ± 0.97). There was no fully differentiated alveolar cells. The *L. plantarum* treated group also had a higher number of cells in the involution stage (81.71 ± 5.27), followed by cells poorly differentiated (15.71 ± 5.94) ($p < 0.05$), followed by the percentage of cells in the intermediate stage (2.30 ± 1.37) ($p < 0.05$), and fully differentiated (0.28 ± 0.46) that no presented statistical difference from intermediated stage ($p > 0.05$). The only alveolar cells that showed statistical differences between the saline group and *L. plantarum* was the intermediate stage of differentiation ($p < 0.05$). No differences occurred on the percentage of alveolar cells at involution; poor differentiated and fully differentiated comparing the groups of saline and *L. plantarum* ($p > 0.05$).

Analysis of biochemical composition of milk of rats

The lactating rats were milked on the 12nd and 19th day of lactation. Milk composition was analyzed for triglycerides, cholesterol, protein and lactose content. The treatment with *L. plantarum* Lp62 increased significantly the triglycerides concentration compared to the saline in the two different periods milking, on the 12nd day, 34.54 ± 1.8 g/L for *L. plantarum* group and 20.67 ± 2.75 g/L for saline group. At the 19th day, the triglycerides of the milk were 38.75 ± 3.70 g/L for treated group and 29.87 ± 2.01 g/L for saline group ($p < 0.05$) (Fig 10). Similarly, the treatment with *L. plantarum* Lp62 increased significantly the cholesterol concentration compared to the saline in the two different periods milking, on the 12nd day, 10.06 ± 0.46 g/L for *L. plantarum* group and 5.80 ± 0.42 g/L for saline group. At the 19th day, the cholesterol of the milk was 10.29 ± 0.33 g/L for treated group and 7.43 ± 0.42 g/L for saline group ($p < 0.05$) (Fig 11). Furthermore, the treatment with *L. plantarum* Lp62 increased significantly the total protein concentration compared to the saline in the two different periods milking, on the 12nd day, 758.20 ± 49.01 g/L for *L. plantarum* group and 486.1 ± 30.17 g/L for saline group. At the 19th day, the total protein of the milk was 780.90 ± 29.43 g/L for treated group and 563.70 ± 64.89 g/L for saline group ($p < 0.05$) (Fig 12). Finally, the treatment with *L. plantarum* Lp62 did not alter significantly the lactose concentration compared to the saline in the two different periods milking, on the 12nd day, 9.33 ± 0.34 g/L for *L. plantarum* group and 9.76 ± 0.27 g/L for saline group. At the 19th day, the lactose of the milk was 9.14 ± 0.56 g/L for *L. plantarum* treated group and 8.44 ± 0.96 g/L for saline group ($p > 0.05$) (Fig 13).

Analysis of TNF- α and IL-10 levels in milk of rats

The treatment with *L. plantarum* Lp62 decreased significantly the milk levels of cytokine TNF- α compared to the saline in the two different periods milking, on the 12nd day, 23.26 ± 20.55 pg/mL for *L. plantarum* group and 46.25 ± 31.15 pg/mL for saline group. At the 19th day, the cytokine level of milk was 20.97 ± 23.59 g/L for treated group and 36.72 ± 25.21 pg/mL for saline group ($p < 0.05$) (Fig 14). The treatment with *L. plantarum* Lp62 did not alter significantly the IL-10 milk levels compared to the saline in the two different periods milking, on the 12nd day, 5.58 ± 14.19 pg/mL for *L. plantarum* group and 15.58 ± 26.28 pg/mL for saline group. At the 19th day, the cytokine level of milk was 4.96 ± 10.94 g/L for treated group and 21.65 ± 35.79 pg/mL for saline group ($p < 0.05$) (Fig 15).

Discussion

Milk production is essential for optimal feeding of infants and has a direct impact on growth, development, and health in neonatal period [29]. Breastfeeding is influenced by nutritional and non-nutritional factors (associated with endocrinology, health, climate, and management) that affect milk synthesis and secretion [30]. Probiotics are live microorganisms that exert beneficial effects on the host when administered in a suitable amount [1], highlighting the lactic acid bacteria (*Lactobacillus*, *Streptococci*, bifidobacteria). There are reports of beneficial effect of supplementing the animal feed with probiotics on milk yield, milk fat and milk protein content [31], weight gain, and growth performance of the pups [32–34]. Although, milk yield affected by probiotics supplementation is diet and animal-dependent [35].

Thus, to evaluate the effects of the supplementation with *L. plantarum* Lp62 on lactation, it was started the administration of probiotic seven days before delivery and throughout lactation. During the lactation, milk yields in rats increase from day 2 to 14 and a decrease in activity appeared to be entirely responsible for the decrease in yield between 14th and 21st day [36]. In our study, the treatment with *L. plantarum* Lp62 has shown no difference in the total milk yield or time of breastfeeding comparing to saline group. Litter weight gain is commonly used as an index of milk secretion. Direct estimates of yield milk is obtained by measuring litter weight gain during suckling intervals that follow some period of separation of dams and litters, corrected for insensible weight loss of the pups [37–39]. Although, this approach is subject to error for the following reasons: the separation period of four hours may alter *in vivo* yield; and such an estimate is generally obtained over a short period of time (one hour), and may not represent true milk yield over longer periods.

It is known that probiotic supplementation during pregnancy and lactation can modulate breast milk composition, with immune benefits being transferred to their infants [40]. In this study, higher levels of triglyceride, cholesterol and total proteins were obtained on the milk samples collected on days 12nd and 19th from the dams treated with *L. plantarum* Lp62 in relation to saline group. However, the supplementation with *L. plantarum* Lp62 did not affect lactose concentration on milk. Those results have shown positive effects on the milk nutritional value. Similarly, other study with probiotics supplementation demonstrated increase of fat and protein on ewe milk composition by 8.7% and 10.9%, respectively. Supplementation with *Bifidobacterium licheniformis* and *B. subtilis* in ewes had a beneficial effect on milk yields, as well as fat and protein of milk content [41]. The alteration on milk composition in this study occurred when the dam was treated two weeks before delivery and during lactation (3 weeks). Other studies also reported increased milk fat percentage when *Prevotella bryantii* 25A was fed to dairy cows from 3 weeks pre-partum to 7 weeks post-partum and [42] an increase in 4% of fat milk of cows treated with *Propionibacterium*/day from 2 weeks pre-partum to 30 weeks post-partum [43].

Probably, the higher nutritional value of the milk of the dams treated with *L. plantarum* Lp62 reflected in a greater daily weight gain, resulting in a higher total weight gain of the rat pups. In clinical trials, probiotics have been reported to enhance the growth of many domestic animals including cows, neonatal calves and piglets, broilers [44], and humans [45]. The higher weight gain of the pups probably occurred due to the increased levels of cholesterol, triglycerides and proteins in milk, a consumption of milk with a better quality, with higher nutritional value [46]. Similar to our results, Purcell et al. (2011) [47] found differences in the nutritional composition of the dam's milk, which contributed to the differences in body weight of pups. Del Prado et al. (1997) [48], in a similar study, also found an increase in the body weight of offspring preceded by an increase in fat content of breast milk. The increased of fat and protein content was possibly due the action of *L. plantarum* in the gastrointestinal tract, not only replacing pathogenic bacteria, but also producing nutrients by stimulating the release of more digestive enzymes, resulting in an enhanced and more rapid digestion process [33, 49]. In monogastric animals, probiotics are believed to act in the intestine helping in the better utilization of nutrients, thus improving body weight, condition and milk production [33, 46]. Regardless of the benefits, the mechanism improving milk quality is not yet clear, depending of the specie treated and probiotic used.

Another hypothesis for the higher growth of the pups could be explained by the beneficial metabolic effects of *L. plantarum* Lp62 in the pup's body. Studies showed that colostrum and milk from healthy women contain lactic acid bacteria, demonstrating mother-infant transfer of bacterial strains through breastfeeding [50, 51]. Oral administration of lactobacilli strains were done in lactating women, and *Lactobacillus* was isolated in more than 50% of women's milk [52, 53]. Bacteria also have been detected in chorioamnion and amniotic fluid from pregnant women and in umbilical cord blood obtained from healthy neonates born, either by vaginal or cesarean delivery, suggesting that colonization occurs of fetal skin and digestive tract in utero [52, 54–56]. However, majority of studies support that the transfer of lactobacilli from the mother to the pups occur from the maternal gastrointestinal tract to human milk [53, 57, 58], from milk to the neonatal gastrointestinal tract [59, 60]. Thus, it is unclear when the beneficial effect of microorganism at the early life of pups could occurs, on the fetus in utero, during the neonatal and weaning periods [61]. Langa (2006) [62] reported that the rates of translocation of some lactic acid bacteria is 0.002-0.009% after 2 hours. The mammary microbiota starts to development during the last third of pregnancy, reaches the highest complexity at the end of such period, remains quite constant throughout lactation and declines sharply at weaning, and disappear in the mammary involution [63].

In addition, some lactobacilli and bifidobacteria, including that species isolated in milk, may help to create a specific healthy microbiota in infant gut [64, 65]. This microorganisms might also contribute to infant digestion through the breakdown of sugars and proteins, important effect having in account that transit of food through the gastrointestinal tract is shorter in infants than in adults, and the pH of stomach is also higher than adult. Thus, the human milk lactobacilli strains are metabolically active in the infant gut and increase production of functional metabolites such butyrate, which is main energy source of colonocytes and a relevant compound in the modulation of intestinal function. As a result, the infant could gain more weight during the weaning [66, 67]. A study investigating the influence of the oral microbiota composition on pregnancy outcome in 300 pregnant women reveal that some bacteria, such as *L. casei*, were associated with slightly high birth weight and normal delivery [68].

Several papers have shown that probiotic supplementation to women during pregnancy and lactation can modulate the microbial milk composition and the level of different breast milk

immunity and immunity-modulating molecules, with health benefits ranging from gastrointestinal symptoms to allergies, transferred to the children [69]. A few reports have shown that LAB isolated from human milk are able to modulate both natural and acquired immune responses in mice and humans [70, 71], possess potent anti-bacterial activities to reduce the incidence and severity of infections [72], exert efficacy to treat infectious mastitis [53], and play important roles in the infant [66]. Probiotics modulate the immune effect by interacting with cellular receptors, enhancing the response to pathogens, or reducing chronic inflammatory responses [73, 74].

In the evaluation of the anti-inflammatory cytokine profile, the IL-10 levels in milk from the Lacto-treated dams did not differ statistically from the control group. Santos et al. (2016) [75] investigated the effect of pool of *L. fermentum* and *L. plantarum* from cocoa fermentation, including *L. plantarum* Lp62, in an experimental colitis model, and observed a reduction of the total number of blood leukocytes, mainly neutrophil and monocyte, caused downregulation of IFN- γ production, while inducing the anti-inflammatory cytokine IL-10. IL-10 acts by modulating the inflammatory response and restoring tolerance to luminal antigens [76]. IL-10 plays a pivotal role in the maintenance of homeostasis and suppress of inflammation [77] and may be responsible for the reduction of colic symptoms in the infants.

In the evaluation of the pro-inflammatory cytokine profile, our data shows a significant decrease of TNF- α in breast milk in Lacto-treated dams, in both days that collected the milk. Jiang et al. (2016) [78] also showed decreased of TNF- α , suggesting a potential anti-inflammatory property of *L. plantarum* WLPL04. Saliganti et al. (2016) [79] also showed lower TNF- α concentrations recorded on the seventh and 14th post-weaning days in newborns whose mothers had been fed with probiotic. TNF- α has been detected in breast milk at sufficient levels to have effects on the development and functioning of the infant immune system [80]. TNF- α is secreted by macrophages in the milk and the mammary endothelium, and its presence is thought to improve the immune defense components in the neonatal lacking in TNF- α production [81, 82]. Milk TNF- α was also negatively associated with infant lean mass, but not fat mass [83]. Previously, documented in cancer and other catabolic conditions that muscle wasting (cachexia) is the product of both defects in the insulin/IGF-1 signaling pathways and increases in TNF- α [83], and may also influence nutrient partitioning during growth [83], including the development of lean body mass stores. Possibly, the lower levels of TNF- α in milk of Lacto-treated dams, can be aided or increased of weight gain, may have collaborated with increased weight gain of the pups.

As discussed before, it is reasonable that the health of suckling pups can further be better by improving the health and productivity of their mother during pregnancy and lactation [33]. 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 [84]. In this study, there was no difference in the loss of weight of dam rats between the two groups during the breastfeeding period. It was expect that there would be greater weight loss from the Lacto-treated dams in comparison to the saline group, because the milk composition presented higher levels of cholesterol, triglycerides and total protein. The milk lipid is derived from triacylglycerol and non-esterified fatty acids taken up from the blood [85]. This large requirement of the gland for glucose and triacylglycerol implies that the rate of production or entry of these substrates is increased and/or their rate of utilization by other tissues is decreased. Part of the increased requirement can be met by the higher dietary intake, but part must be met by changes in the metabolism of other tissues [84]. Probably, the Lacto-treated dams increased the food intake during the lactation as a result of high energy requirements associated with the process of milk synthesis. Alexopoulos et al. (2004) [46] showed that a probiotic containing

Bacillus licheniformis and *B. subtilis* spores increased feed intake and fat absorbance, and reduced the weight loss of sow during lactation, and an improvement in milk production.

Involution of the mammary gland in the mouse begins when pups stop suckling, when they transition to a solid diet [86]. Based on those changes, the histological analysis of the mammary glands it was analyzed at 20th day of lactation. According with our results, there was no significantly different in the means of alveoli, lobules, ducts or blood vessels between Lacto-treated and saline group. The classification of epithelial cells stage is a significant and relevant measure of mammary tissue function during lactation. Most of the alveolar cells, both in the saline and *L. plantarum* group, were in involution stage (75.59% and 81.71%, respectively), that shows presence of apoptotic cells in the epithelium or lumen of the alveoli, disorganized appearance and an increase of the stroma surrounding the alveoli, indicating the end of lactation [87]. These characteristics of mammary gland involution occur due to the date on which the glands were removed, the 20th day of lactation, when the pups started to changing the dam's milk by the standard feed, and stop breastfeeding at the same frequency [87, 88]. Furthermore, best lactational performance is not only obtained under conditions that increases the proliferation of mammary cells or decrease apoptosis, or that promote a great biochemical and structural differentiation of the mammary epithelium. Higher lactational performance may also occur under conditions that improve the synthesis and secretion of milk components [88], that occurred in the gland before the day of the removal of the glands.

Conclusion

Probiotics produce significant changes in the intestinal microbiota and immune system. The treatment of dams during pregnancy and lactation with *L. plantarum* Lp62 showed positive effects in increasing the nutritional content of protein, triglycerides and cholesterol in the milk of rats and decreased TNF- α levels, which could contributed to the higher weight of the pups, without higher loss of weight of the dams. The *L. plantarum* Lp62, isolated from cocoa bean fermentation, have probiotic potential to be used as a supplementation during the pregnancy and lactation. Although, the use of *L. plantarum* Lp62 in humans cannot be recommend yet. More studies should be conducted to confirm our results, to verify the safety of its use, and to identify the mechanisms of action of these bacteria and its substances produced.

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). The authors are also very grateful to all student volunteers who took part in this study and to Professor Carla Cristina Romano form State University of Santa Cruz for microorganism donation. R.Y., A.P.T.U., L.M.M., M.P.C. conceived and designed the study; G.C.M., R.Y., M.R.T.C., E.P.S., A.V.M. was responsible for generation, collection, assembly, analysis and interpretation of data; G.C.M., M.R.T.C., R.Y. performed the statistical analysis; G.C.M., R.Y. wrote the manuscript, R.Y., L.M.M., M.P.C. revised the manuscript. All the authors approved the final version of the manuscript before submission.

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.

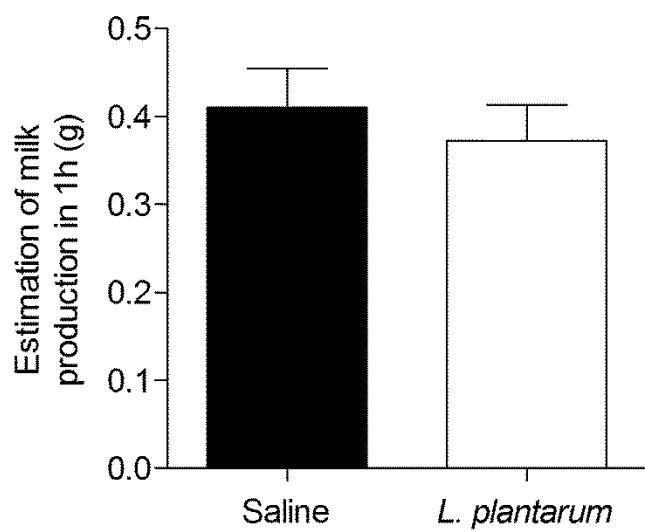


Figure 1. Estimation of milk production in 1 hour of breastfeeding (g) of the groups treated with Saline solution 0.9% and *Lactobacillus plantarum* Lp62. The results are presented as the means \pm SEM ($n = 8$). $p > 0.05$ by Mann Whitney test, compared to saline group.

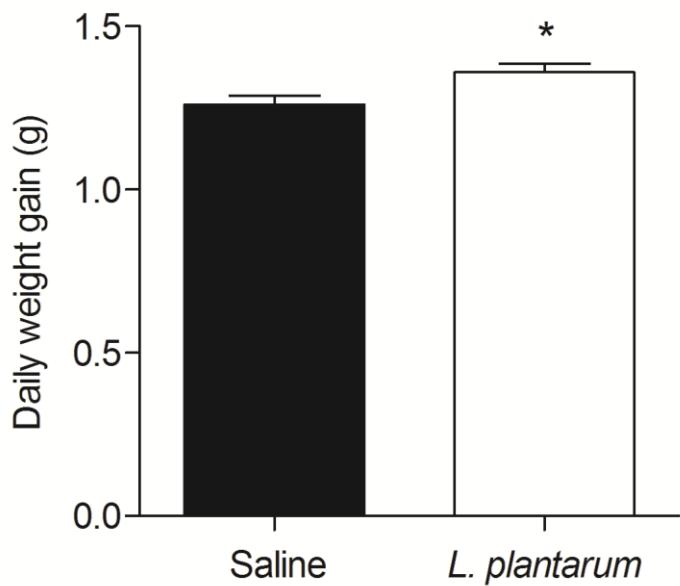


Figure 2. Daily weight gain of pups (g), of the groups treated with saline solution 0.9% and *Lactobacillus plantarum* Lp62. The results are presented as the means \pm SEM ($n = 8$). * $p < 0.05$ by Mann Whitney test compared to saline group.

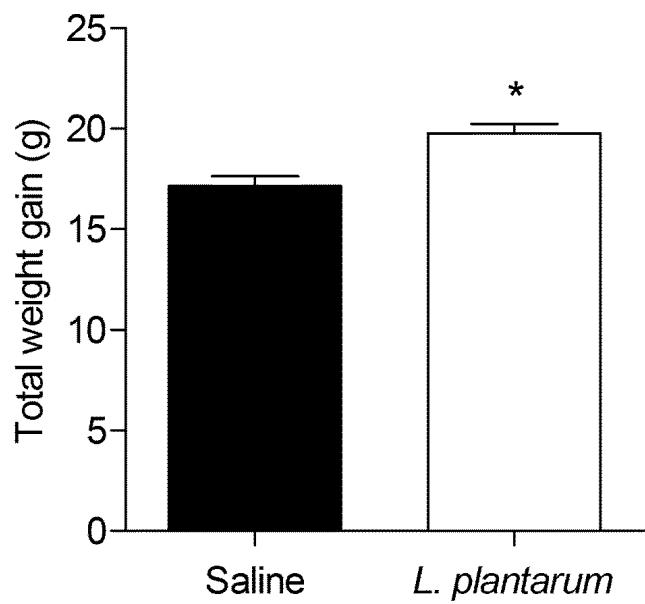


Figure 3. Total weight gain of pups (g), of the groups treated with saline solution 0.9% and *Lactobacillus plantarum* Lp62. The results are presented as the means \pm SEM ($n = 8$). * $p < 0.05$ by unpaired t test compared to saline group.

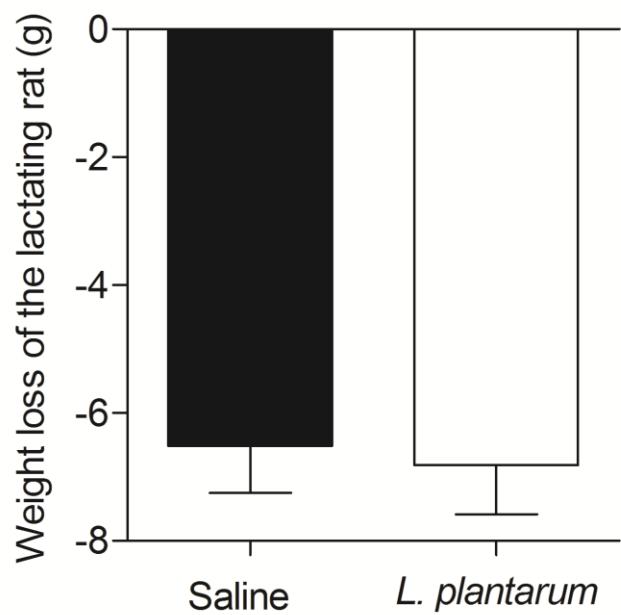


Figure 4. Weight loss of the lactating rat during the 19 days of treatment with 0.9% saline solution or *L. plantarum* Lp62. The results are presented as the means \pm SEM of the weight loss of the lactating rat (g) ($n = 8$). $p > 0.05$ by Mann Whitney test, compared to saline group.

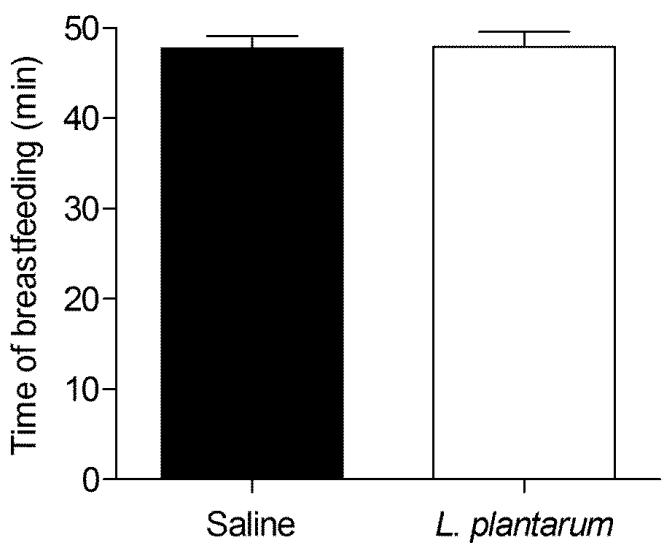


Figure 5. Time of breastfeeding of the lactating rat during the 19 days of treatment with 0.9% saline solution or *L. plantarum* Lp62. The results are presented as the means \pm SEM of the weight loss of the lactating rat (g) ($n = 8$). $p > 0.05$ by Mann Whitney test, compared to saline group.

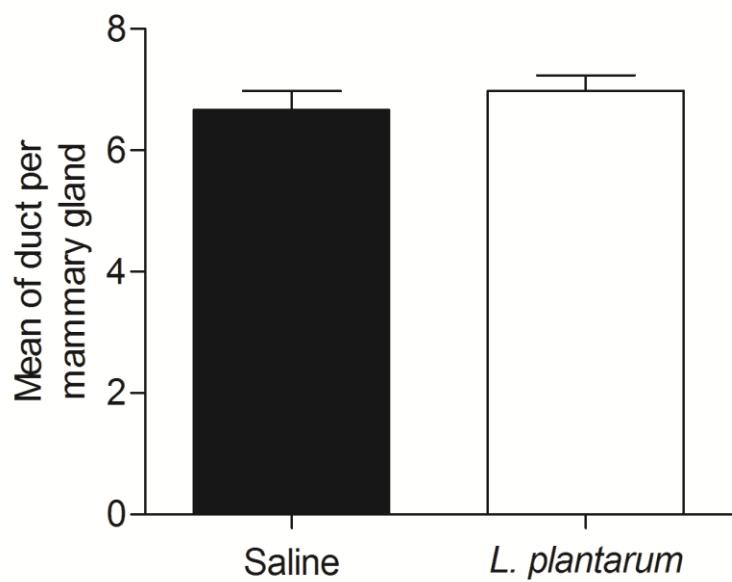


Figure 6. Mean of ducts per mammary gland of saline and *L. plantarum* Lp62 treated rats. The results are presented as the means \pm SEM of ducts ($n = 8$). $p > 0.05$ by Mann Whitney t test, compared to saline group.

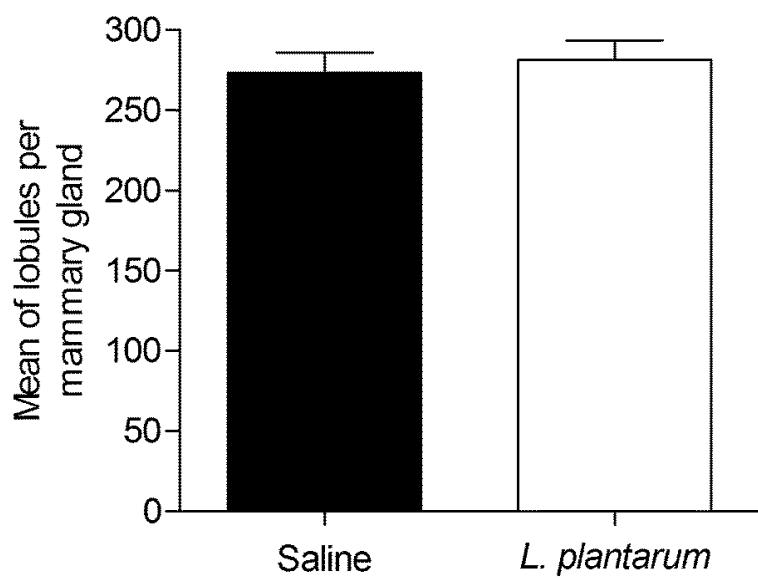


Figure 7. Mean of lobules per mammary gland of saline and *L. plantarum* Lp62 treated rats. The results are presented as the means \pm SEM of lobules ($n = 8$). $p > 0.05$ by Mann Whitney t test, compared to saline group.

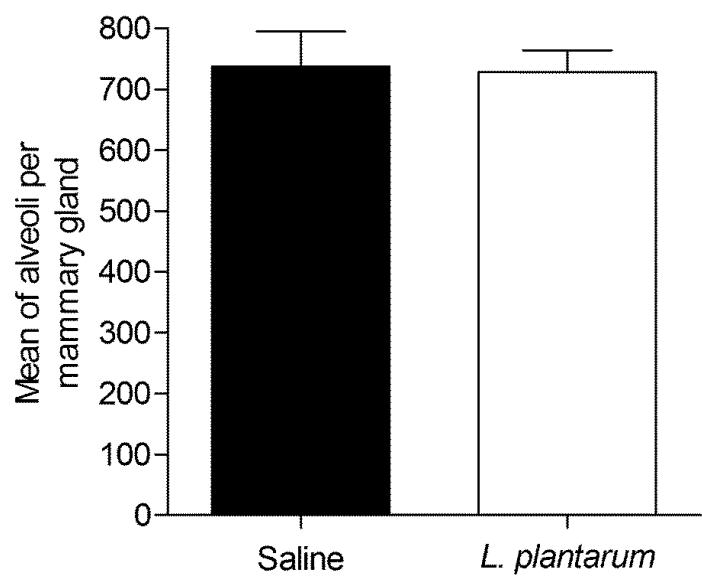


Figure 8. Mean of alveoli per mammary gland of saline and *L. plantarum* Lp62 treated rats. The results are presented as the means \pm SEM of alveoli ($n = 8$). $p > 0.05$ by Mann Whitney test, compared to saline group.

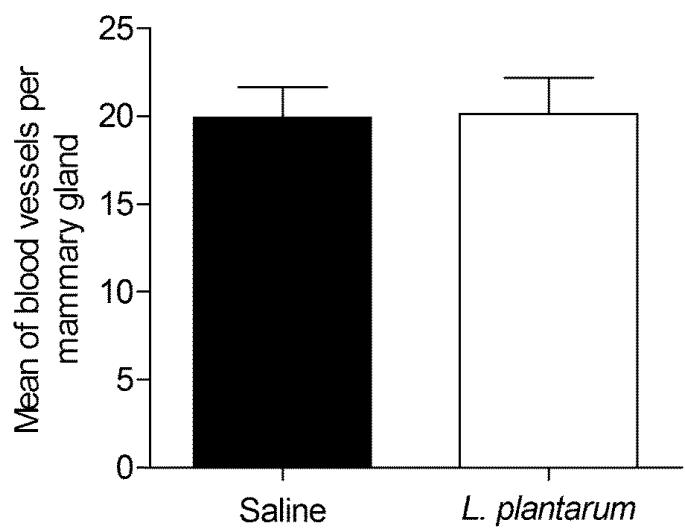


Figure 9. Mean of blood vessels per mammary gland of saline and *L. plantarum* Lp62 treated rats. The results are presented as the means \pm SEM of blood vessels ($n = 8$). $p > 0.05$ by Mann Whitney test, compared to saline group.

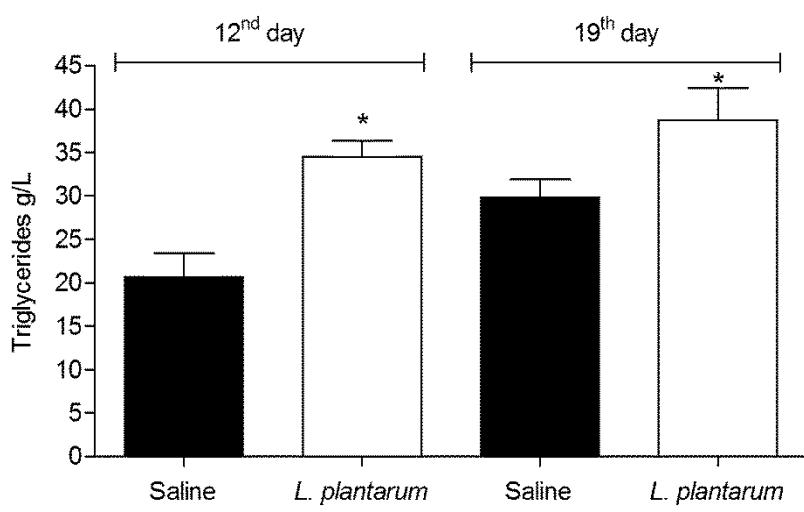


Figure 10. Total concentration of milk's triglycerides of saline and *L. plantarum* Lp62 treated rats. Concentration of triglycerides on the 12th and 19th day of lactation. The results are presented as the means \pm SEM of triglyceride concentration (g/L) ($n = 8$). * $p < 0.05$ by unpaired t test for 12th day and Mann Whitney test for 19th day, compared to saline group.

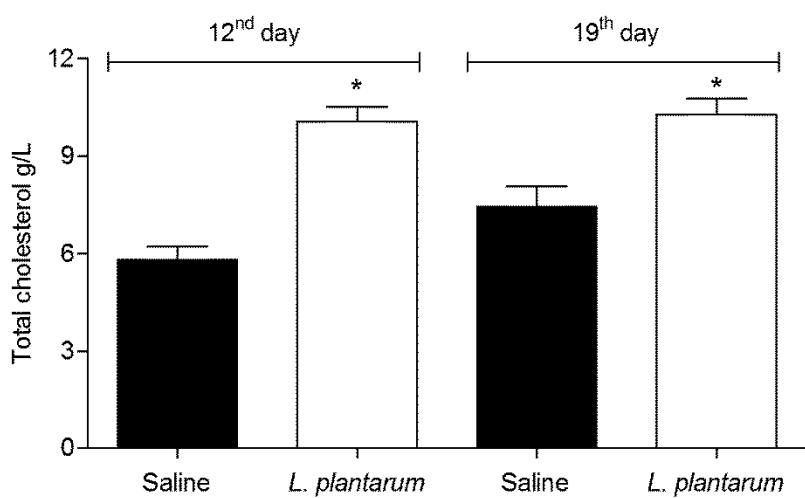


Figure 11. Total concentration of milk's cholesterol of saline and *L. plantarum* Lp62 treated rats. Concentration of total cholesterol on the 12th and 19th day of lactation. The results are presented as the means \pm SEM of total cholesterol concentration (g/L) ($n = 8$). * $p < 0.05$ by unpaired t test for 12th day and Mann Whitney test for 19th day, compared to saline group.

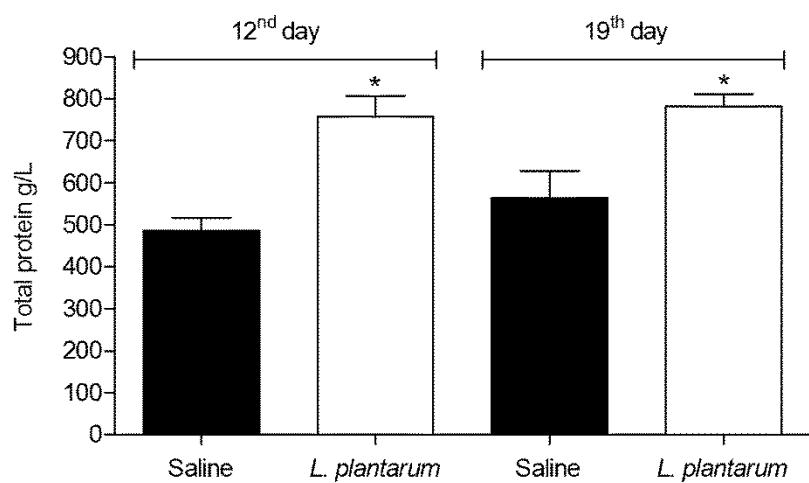


Figure 12. Total concentration of milk's total protein of saline and *L. plantarum* Lp62 treated rats. Concentration of total protein on the 12th and 19th day of lactation. The results are presented as the means \pm SEM of total protein concentration (g/L) ($n = 8$). * $p < 0.05$ by unpaired t test, compared to saline group.

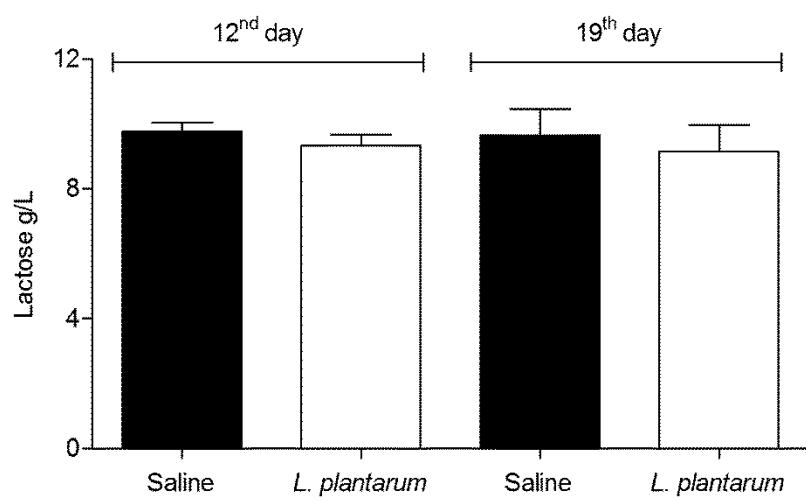


Figure 13. Total concentration of milk's lactose of saline and *L. plantarum* Lp62 treated rats. Concentration of total protein on the 12th and 19th day of lactation. The results are presented as the means \pm SEM of total lactose concentration (g/L) ($n = 8$). $p > 0.05$ by unpaired t test for 12th day and Mann Whitney test for 19th day, compared to saline group.

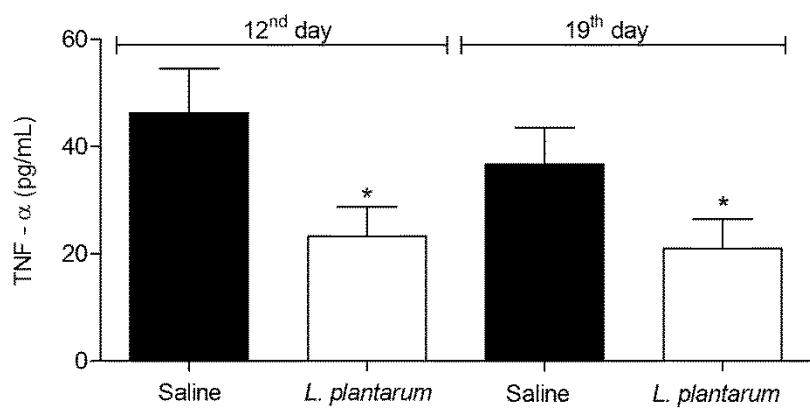


Figure 14. Milk levels of cytokine TNF- α of saline and *L. plantarum* Lp62 treated rats (pg/mL) ($n = 8$). * $p < 0.05$ by Mann Whitney test, compared to saline group.

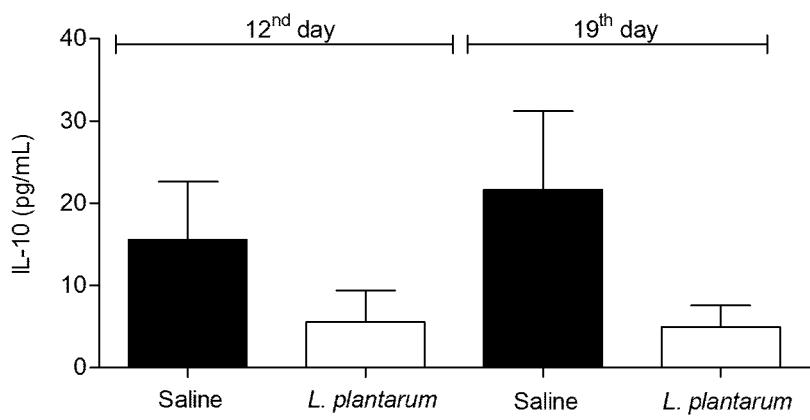


Figure 15. Milk levels of cytokine IL-10 of saline and *L. plantarum* Lp62 treated rats (pg/mL) ($n = 8$). $p > 0.05$ by Mann Whitney test, compared to saline group.

Table 1. Percentage of alveolar epithelial cells with each cell differentiation stage during

Cell differentiation stage	Treatments	
	Saline (%)	<i>L. plantarum</i> Lp62 (%)
Poorly differentiated (G1)	23,82 ± 10,76 ^b	15,71 ± 5,94 ^b
Intermediate differentiation (G2)	0,58 ± 0,97 [*]	2,30 ± 1,37 ^c
Fully differentiated (G3)	0 ^c	0,28 ± 0,46 ^c
Involution	75,59 ± 11,15 ^d	81,71 ± 5,27 ^d

lactation.

Data referring to percentage of the mean ± SEM of the four stages of differentiation of the mammary glands of rats treated with saline or with *L. plantarum* Lp62. Group of rats (n = 8). The same letters show no statistical difference against the four cell differentiation stages ($p > 0.05$), ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison Test. * Statistical difference between saline and *L. plantarum* LP62 group ($p < 0.05$), Mann Whitney test.

References

1. FAO/WHO (2001) Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Expert Consult Rep Co'rdoa, Argentina Food Agric Organ United Nations World Heal Organ 1–4.
2. Agostoni C, Axelsson I, Braegger C, et al (2004) Probiotic bacteria in dietetic products for infants: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 38:365–374.
3. Rioux KP, Madsen KL, Fedorak RN (2005) The role of enteric microflora in inflammatory bowel disease: human and animal studies with probiotics and prebiotics. *Gastroenterol Clin North Am* 34:465–82, ix. doi: 10.1016/j.gtc.2005.05.005
4. Felis GE, Dellaglio F (2007) Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Curr Issues Intest Microbiol* 8:44–61.
5. Agaliya PJ, Jeevaratnam K (2012) Screening of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented idli batter for probiotic properties. *African J Biotechnol* 11:12856–12864. doi: 10.5897/AJB12.1825
6. Min Hsiu C, Shu Feng H, Jiau Hua C, et al (2016) Antibacterial activity *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented vegetables and investigation of the plantaricin genes. *African J Microbiol Res* 10:796–803. doi: 10.5897/AJMR2016.7922
7. Bringel F, Castioni A, Olukoya DK, et al (2005) *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* subsp. nov., isolated from vegetable matrices. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:1629–1634. doi: 10.1099/ijss.0.63333-0
8. Khemariya P, Singh S, Jaiswal N, Chaurasia SNS (2016) Isolation and Identification of *Lactobacillus plantarum* from Vegetable Samples. *Food Biotechnol* 30:49–62. doi: 10.1080/08905436.2015.1132428
9. Schillinger U, Lücke FK (1989) Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl Environ Microbiol* 55:1901–1906.
10. Valan Arasu M, Jung MW, Kim DH, et al (2015) Identification and phylogenetic characterization of novel *Lactobacillus plantarum* species and their metabolite profiles in grass silage. *Ann Microbiol* 65:15–25. doi: 10.1007/s13213-014-0830-2
11. Berbegal C, Pena N, Russo P, et al (2016) Technological properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from grape must fermentation. *Food Microbiol* 57:187–194. doi: 10.1016/j.fm.2016.03.002
12. Wang J, Ji H, Zhang D, et al (2011) Assessment of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* ZLP001 isolated from gastrointestinal tract of weaning pigs. *African J Biotechnol* 10:11303–11308. doi: 10.5897/AJB11.255
13. Al Kassaa I, Hamze M, Hober D, et al (2014) Identification of vaginal lactobacilli with potential probiotic properties isolated from women in North Lebanon. *Microb Ecol* 67:722–734. doi: 10.1007/s00248-014-0384-7
14. Fiocco D, Capozzi V, Collins M, et al (2010) Characterization of the CtsR stress response regulon in *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* 192:896–900. doi: 10.1128/JB.01122-09
15. Russo P, Arena MP, Fiocco D, et al (2017) *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *Int J Food Microbiol* 247:48–54. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.027

16. UNICEF WHO and, Organization WH (2009) Baby-friendly hospital initiative : revised, updated and expanded for integrated care. Section 1, Background and implementation. World Heal Organ. doi: ISBN 978 92 4 159496 7 (v. 1)
17. Albesharat R, Ehrmann MA, Korakli M, et al (2011) Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Syst Appl Microbiol* 34:148–155. doi: 10.1016/j.syapm.2010.12.001
18. Rodríguez JM (2014) The origin of human milk bacteria: is there a bacterial enteromammary pathway during late pregnancy and lactation? *Adv Nutr* 5:779–84. doi: 10.3945/an.114.007229
19. Damaceno QS, Souza JP, Nicoli JR, et al (2017) Evaluation of Potential Probiotics Isolated from Human Milk and Colostrum. *Probiotics Antimicrob Proteins* 1–9. doi: 10.1007/s12602-017-9270-1
20. Baldassarre ME, Di Mauro A, Mastromarino P, et al (2016) 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* 8:1–13. doi: 10.3390/nu8110677
21. Ferreira T, Melo TA, Almeida ME, et al (2016) Immunomodulatory Effects of Lactobacillus plantarum Lp62 on Intestinal Epithelial and Mononuclear Cells. doi: 10.1155/2016/8404156
22. Verna EC, Lucak S (2010) Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? *Therap Adv Gastroenterol* 3:307–19. doi: 10.1177/1756283X10373814
23. Akers RM, Capuco A V., Keys JE (2006) Mammary histology and alveolar cell differentiation during late gestation and early lactation in mammary tissue of beef and dairy heifers. *Livest Sci* 105:44–49. doi: 10.1016/j.livsci.2006.04.026
24. Grigor MR, Poczw Z, Arthur PG (1986) Milk lipid synthesis and secretion during milk stasis in the rat. *J Nutr* 116:1789–1797.
25. Oliveira E, Pinheiro CR, Santos-Silva AP, et al (2010) Nicotine exposure affects mother's and pup's nutritional, biochemical, and hormonal profiles during lactation in rats. *J Endocrinol* 205:159–170. doi: 10.1677/JOE-09-0430
26. Troina AA, Figueiredo MS, Passos MCF, et al (2012) Flaxseed bioactive compounds change milk, hormonal and biochemical parameters of dams and offspring during lactation. *Food Chem Toxicol* 50:2388–2396. doi: 10.1016/j.fct.2012.04.040
27. Costa TH, Dorea JG (1992) Concentration of fat, protein, lactose and energy in milk of mothers using hormonal contraceptives. *Ann Trop Paediatr* 12:203–209.
28. Penha-Silva N, Fonseca AM, Brito AG, et al (2004) Determinação rápida de açúcares redutores com ácido pícrico para uso biotecnológico. *Biosci J* 20:183–8.
29. Sjolin S, Hofvander Y, Hillervik C (1977) Factors related to early termination of breast feeding. A retrospective study in Sweden. *Acta Paediatr Scand* 66:505–511.
30. Tabares FP, Jaramillo JVB, Ruiz-Cort??s ZT (2014) Pharmacological Overview of Galactagogues. *Vet Med Int*. doi: 10.1155/2014/602894
31. Shreedhar JN, Patil M, Kumar P (2016) Effect of Probiotics Supplementation on Milk Yield and Its Composition in Lactating Holstein Fresien and Deoni Cross Bred Cows. *J Med Bioeng* 5:19–23. doi: 10.12720/jomb.5.1.19-23
32. Bula S, Ositis U, Strikauska S, Degola L (2012) Impact of Probiotic Supplement on the Weight Lose of Sows and Weaning Weight of Piglet. 1:1122–1129.
33. 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.
34. Zhao P, Upadhyaya SD, Li J, Kim I (2015) Comparison effects of dietary iron dextran and bacterial-iron supplementation on growth performance, fecal microbial flora, and blood profiles in sows and their litters. *Anim Sci J* 86:937–942. doi: 10.1111/asj.12378
 35. Chiquette J (2009) The Role of probiotics in promoting dairy production. *WCDS Adv Dairy Technol* 21:143–157.
 36. Knight CH, Docherty AH, Peaker M (1984) Milk yield in rats in relation to activity and size of the mammary secretory cell population. *J Dairy Res* 51:29–35.
 37. Morag M (1970) Estimation of milk yield in the rat. *Lab Anim* 4:259–272. doi: 10.1258/002367770781071671
 38. Brody S, Nisbet R (1938) Growth and development with special reference to domestic animals. 47. A comparison of the amounts and energetic efficiencies of milk production in rat and dairy cow. *Growth Dev. with Spec. Ref. to Domest. Anim.* 47. A Comp. Amount. Energ. Effic. milk Prod. rat dairy cow.
 39. Reddy RR, Donker JD (1965) Lactation studies.vi. Effects of different intervals between nursing and duration of suckling on rate of milk production in sprague-dawley rats in the first lactation. *J Dairy Sci* 48:978–982.
 40. Baldassarre ME, Di Mauro A, Mastromarino P, et al (2016) 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*. doi: 10.3390/nu8110677
 41. Kritas SK, Govaris A, Christodoulopoulos G, Burriel AR (2006) Effect of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* supplementation of ewe's feed on sheep milk production and young lamb mortality. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 53:170–173. doi: 10.1111/j.1439-0442.2006.00815.x
 42. Chiquette J, Allison MJ, Rasmussen MA (2008) *Prevotella bryantii* 25A used as a probiotic in early-lactation dairy cows: effect on ruminal fermentation characteristics, milk production, and milk composition. *J Dairy Sci* 91:3536–3543. doi: 10.3168/jds.2007-0849
 43. Stein DR, Allen DT, Perry EB, et al (2006) Effects of feeding propionibacteria to dairy cows on milk yield, milk components, and reproduction. *J Dairy Sci* 89:111–125. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72074-4
 44. Singh SK, Niranjan PS, Singh UB, et al (2009) Effects of dietary supplementation of probiotics on broiler chicken. *Anim Nutr Feed Technol* 9:23–24.
 45. Penna FJ, Filho LA, Calcadão AC, et al (2000) [Up-to-date clinical and experimental basis for the use of probiotics]. *J Pediatr (Rio J)* 76 Suppl 1:S209-17.
 46. ALEXOPOULOS C, GEORGULAKIS 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.
 47. Purcell RH, Sun B, Pass LL, et al (2011) Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. *Physiol Behav* 104:474–479. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.05.012
 48. Del Prado M, Delgado G, Villalpando S (1997) Maternal lipid intake during pregnancy and lactation alters milk composition and production and litter growth in rats. *J Nutr* 127:458–462.
 49. Suzer C, Çoban D, Kamaci HO, et al (2008) Lactobacillus spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and

- digestive enzyme activities. *Aquaculture* 280:140–145. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.04.020>
50. Martin R, Langa S, Reviriego C, et al (2003) Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* 143:754–758. doi: 10.1016/j.jpeds.2003.09.028
 51. Jost T, Lacroix C, Braegger CP, et al (2014) Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environ Microbiol* 16:2891–2904. doi: 10.1111/1462-2920.12238
 52. Jimenez E, Delgado S, Fernandez L, et al (2008) Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors. *Res Microbiol* 159:595–601. doi: 10.1016/j.resmic.2008.09.001
 53. Arroyo R, Martin V, Maldonado A, et al (2010) Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of Lactobacilli isolated from breast milk. *Clin Infect Dis* 50:1551–1558. doi: 10.1086/652763
 54. Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP (2002) Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG* 109:527–533.
 55. Jimenez E, Fernandez L, Marin ML, et al (2005) Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol* 51:270–274. doi: 10.1007/s00284-005-0020-3
 56. Aagaard K, Ma J, Antony KM, et al (2014) The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* 6:237ra65. doi: 10.1126/scitranslmed.3008599
 57. Jimenez E, Fernandez L, Maldonado A, et al (2008) Oral administration of Lactobacillus strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Appl Environ Microbiol* 74:4650–4655. doi: 10.1128/AEM.02599-07
 58. Abrahamsson TR, Sinkiewicz G, Jakobsson T, et al (2009) Probiotic lactobacilli in breast milk and infant stool in relation to oral intake during the first year of life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 49:349–354. doi: 10.1097/MPG.0b013e31818f091b
 59. Jimenez E, Delgado S, Maldonado A, et al (2008) Staphylococcus epidermidis: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC Microbiol* 8:143. doi: 10.1186/1471-2180-8-143
 60. Martin V, Maldonado-Barragan A, Moles L, et al (2012) Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *J Hum Lact* 28:36–44. doi: 10.1177/0890334411424729
 61. Karlsson CLJ, Molin G, Fåk F, et al (2011) 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* 106:887–895. doi: 10.1017/S0007114511001036
 62. Langa S (2006) Interactions between lactic acid bacteria, intestinal epithelial cells and immune cells: development of in vitro models. Madrid (Spain): Complutense University of Madrid
 63. Fernández L, Langa S, Martín V, 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. Zivkovic AM, German JB, Lebrilla CB, Mills DA (2011) Human milk glycobiome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci* 108:4653–4658. doi: 10.1073/pnas.1000083107
 65. Asakuma S, Hatakeyama E, Urashima T, et al (2011) Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. *J Biol Chem* 286:34583–34592. doi: 10.1074/jbc.M111.248138

66. Maldonado J, Lara-Villoslada F, Sierra S, et al (2010) Safety and tolerance of the human milk probiotic strain *Lactobacillus salivarius* CECT5713 in 6-month-old children. *Nutrition* 26:1082–87.
67. Gil-Campos M, Lopez M, Rodriguez-Benítez M, et al (2012) *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 is safe and well tolerated in infants of 1-6 months of age: a randomized controlled trial. *Pharmacol Res* 65:231–8.
68. Dasanayake AP, Li Y, Wiener H, et al (2005) Salivary *Actinomyces naeslundii* genospecies 2 and *Lactobacillus casei* levels predict pregnancy outcomes. *J Periodontol* 76:171–177. doi: 10.1902/jop.2005.76.2.171
69. Rautava S, Luoto R, Salminen S, Isolauri E (2012) Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9:565–576. doi: 10.1038/nrgastro.2012.144
70. Olivares M, Diaz-Ropero MP, Sierra S, et al (2007) Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition* 23:254–260. doi: 10.1016/j.nut.2007.01.004
71. Diaz-Ropero MP, Martin R, Sierra S, et al (2007) Two *Lactobacillus* strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. *J Appl Microbiol* 102:337–343. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03102.x
72. Olivares M, MP D-R, R M, et al (2006) Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J Appl Microbiol* 101:72–9.
73. Saez-Lara MJ, Gomez-Llorente C, Plaza-Diaz J, Gil A (2015) The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases: a systematic review of randomized human clinical trials. *Biomed Res Int* 2015:505878. doi: 10.1155/2015/505878
74. Oelschlaeger TA (2010) Mechanisms of probiotic actions - A review. *Int J Med Microbiol* 300:57–62. doi: 10.1016/j.ijmm.2009.08.005
75. 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.* doi: 10.4238/gmr.15038097
76. Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, et al (2003) Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 38:165–172.
77. Kole A, Maloy KJ (2014) Control of intestinal inflammation by interleukin-10. *Curr Top Microbiol Immunol* 380:19–38. doi: 10.1007/978-3-662-43492-5_2
78. Jiang M, Zhang F, Wan C, et al (2016) Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* WLPL04 isolated from human breast milk. *J Dairy Sci* 99:1736–1746. doi: 10.3168/jds.2015-10434
79. Saliganti V, Kapila R, Kapila S (2016) Consumption of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* (MTCC: 5897) containing fermented milk plays a key role in development of the immune system in newborn mice during the suckling-weaning transition. *Microbiol Immunol* 60:261–267. doi: 10.1111/1348-0421.12342
80. Rudloff HE, Schmalstieg FCJ, Mushtaha AA, et al (1992) Tumor necrosis factor-alpha in human milk. *Pediatr Res* 31:29–33. doi: 10.1203/00006450-199201000-00005
81. English BK, Burchett SK, English JD, et al (1988) Production of lymphotoxin and tumor necrosis factor by human neonatal mononuclear cells. *Pediatr Res* 24:717.
82. Buescher ES, Malinowska I (1996) Soluble receptors and cytokine antagonists in human milk. *Pediatr Res* 40:839–844. doi: 10.1203/00006450-199612000-00011
83. Fields DA, Demerath EW (2012) Relationship of insulin, glucose, leptin, IL-6 and TNF-

- ?? in human breast milk with infant growth and body composition. *Pediatr Obes* 7:304–312. doi: 10.1111/j.2047-6310.2012.00059.x
- 84. Williamson DH (1980) Integration of metabolism in tissues of the lactating rat. *FEBS Lett* 117:K93–K105. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(80\)80574-6](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(80)80574-6)
 - 85. Hawkins RA, Williamson DH (1972) Measurements of substrate uptake by mammary gland of the rat. *Biochem J* 129:1171–1173.
 - 86. Atabai K, Sheppard D, Werb Z (2007) Roles of the innate immune system in mammary gland remodeling during involution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 12:37–45. doi: 10.1007/s10911-007-9036-6
 - 87. Akers RM, Capuco A V, Keys JE (2017) Mammary histology and alveolar cell differentiation during late gestation and early lactation in mammary tissue of beef and dairy heifers. *Livest Sci* 105:44–49. doi: 10.1016/j.livsci.2006.04.026
 - 88. Masso-Welch PA, Darcy KM, Stangle-Castor NC, Ip MM (2000) A developmental atlas of rat mammary gland histology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5:165–185.

ANEXO

Parecer da comissão em uso de animais.



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 *Lactobacillus* 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 inicio 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 galactogoga; avaliação antimicrobiana de *Lactobacillus plantarum*; avaliação do modelos 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 galactogoga; avaliação da composição do leite; análise histológica das glândulas mamárias; avaliação antimicrobiana de *Lactobacillus plantarum*; 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 Damy (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 CONSUBSTACIADO 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.

Ricardo Evangelista Fraga
Coordenador CEUA-IMS-UFBA

Vitória da Conquista, 03 de maio de 2016.

CEUA-IMS-UFBA - Rua Rio de Contas, 58 – Quadra 17 – Lote 58 – Bairro Candeias
Vitória da Conquista – BA - CEP 45.029-094/ Fone: (77) 3429 2709. E-mail: ceuaimsufba@ufba.br