

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS



Dissertação de Mestrado

**EFEITO PROBIÓTICO DE *Lactococcus lactis* NA PREVENÇÃO E NO TRATAMENTO
DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS EM CAMUNDONGOS: UMA REVISÃO
SISTEMÁTICA**

Tamires Rizzi

Pelotas – RS
2022

TAMIRES RIZZI

EFEITO PROBIÓTICO DE *Lactococcus lactis* NA PREVENÇÃO E NO TRATAMENTO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS EM CAMUNDONGOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Pieniz

Co-orientadores: Dr^a. Thaynã Ramos Flores

Msc. Felipe Mendes Delpino

Pelotas-RS

2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

R627e Rizzi, Tamires

Efeito probiótico de *Lactococcus lactis* na prevenção e no tratamento de doenças inflamatórias intestinais em camundongos : uma revisão sistemática / Tamires Rizzi ; Simone Pieniz, orientadora ; Thaynã Ramos Flores, Felipe Mendes Delpino, coorientadores. – Pelotas, 2022.

59 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. Doença de Crohn. 2. Retocolite ulcerativa. 3. Inflamação. 4. Microbiota. 5. Bactéria ácido láctica *Lactococcus*. I. Pieniz, Simone, orient. II. Flores, Thaynã Ramos, coorient. III. Delpino, Felipe Mendes, coorient. IV. Título.

CDD : 641.1

Elaborada por Maria Inez Figueiredo Figas Machado CRB: 10/1612

Tamires Rizzi

Efeito probiótico de *Lactococcus lactis* na prevenção e no tratamento de doenças inflamatórias intestinais em camundongos: uma revisão sistemática

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Data da Defesa do Projeto: 12/05/2022

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Simone Pieniz (Orientadora)

Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr^a. Thaynã Ramos Flores (Co-orientadora)

Doutora em Epidemiologia pela Universidade Federal de Pelotas

Msc. Felipe Mendes Delpino (Co-orientador)

Mestre em Nutrição e Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

Dr^a. Bruna Celestino Schneider (Membro titular)

Doutora em Epidemiologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Pathise Souto Oliveira (Membro titular)

Doutora em Ciências Bioquímica e Bioprospecção pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^o. Dr^o. Augusto Schneider (Membro suplente)

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, meus pais, Arnildo e Lindair e minhas irmãs Liara e Milena por todo o apoio durante este período que foi repleto de obstáculos, mas que trouxe muitos aprendizados. Sem vocês, nada disto seria possível. Obrigada por tudo, lembrarei eternamente de cada passo, de cada palavra de conforto e de cada incentivo que vocês me deram. Vocês sempre me disseram: não desista, se não der certo, tente outra vez.

Agradeço também a minha orientadora Simone Pieniz, por todo o apoio que me deste desde o início desta jornada, por ter entendido desde o início que não poderia me fazer presente pessoalmente, por ter compreendido as minhas escolhas, as minhas ausências e por toda a palavra de carinho que me deste quando já havia perdido as esperanças de conseguir realizar esse estudo com êxito. Obrigada também por ter feito tudo que estava ao seu alcance para que eu pudesse realizar este estudo durante o período difícil da pandemia.

Agradeço à minha co-orientadora Thaynã Flores por todo o auxílio que me deste, por ter compreendido minhas limitações acerca deste estudo, por ter me atendido em todos os momentos que eu precisei de ajuda. Obrigada por ter dedicado todo este tempo a este estudo e também por ter sanado as minhas dúvidas quando necessário. A sua ajuda foi fundamental.

Agradeço ao meu co-orientador Felipe Delpino, que sempre se mostrou disposto a ajudar e a contribuir com este estudo. Obrigada por ter me auxiliado em diversos momentos, inclusive aos finais de semana e feriados, a sua ajuda foi imprescindível.

Agradeço também à minha psicóloga Daiana, que me incentivou a persistir durante todo este tempo, que me trouxe a luz no final do túnel quando achei que tudo estava perdido. Não existem palavras que possam definir o quanto você foi importante durante este período. As suas palavras me fizeram acreditar que sempre existe uma saída, que sempre podemos olhar por outras perspectivas e que nem tudo que pensamos corresponde fielmente ao que é a realidade.

Agradeço também a todos os amigos e familiares que muitas vezes tiveram que compreender a minha ausência durante este tempo em confraternizações, saídas e

similares. Obrigada às minhas colegas de trabalho, que muitas vezes me trouxeram palavras de carinho quando estive cansada, física e psicologicamente.

Obrigada aos meus queridos pacientes do hospital, que muitas vezes, mesmo sem saber, me deram aulas de superação e de esperança. Vocês fizeram parte desta história.

Muito obrigada!

RESUMO

RIZZI, Tamires. **Efeito probiótico de *Lactococcus lactis* na prevenção e no tratamento de doenças inflamatórias intestinais em camundongos: uma revisão sistemática.** 2022. 59f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos. Faculdade de Nutrição. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

No Brasil, as doenças inflamatórias intestinais acometem, aproximadamente, 10 a 27 indivíduos a cada 100 mil habitantes. Essas patologias são causadas pela interação de fatores genéticos, microbiota e imunorregulação da mucosa intestinal. O efeito benéfico das bactérias ácido lácticas como probióticos no ambiente intestinal vem sendo estudado por muitos pesquisadores, pois os metabólitos ativos liberados por essas bactérias no trânsito intestinal podem permear a camada intestinal para exercer efeitos anti-inflamatórios, estabilizar a camada de muco e auxiliar a cicatrização do epitélio intestinal. Estudos experimentais e observacionais demonstram que a bactéria *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) é capaz de criar e manter um ambiente anti-inflamatório no trato gastrointestinal e, assim, diminuir efetivamente o início da inflamação em doenças como a Retocolite Ulcerativa e a Doença de Crohn. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito probiótico da bactéria ácido láctica *L. lactis* na prevenção e no tratamento de doenças inflamatórias intestinais por meio de uma revisão sistemática da literatura. As bases de dados utilizadas foram *Cochrane Library* e *PubMed* e os descritores utilizados foram *L. lactis*, Inflammatory bowel disease, Prevention, Treatment, Crohn's disease, Ulcerative Retocolitis e Acid Lactic Bacteria. Ao total, foram encontrados 3.320 artigos, seis incluídos na revisão. De acordo com os resultados, é possível sugerir que esta espécie de bactéria ácido láctica pode auxiliar no tratamento e na modulação intestinal de animais que apresentam Retocolite Ulcerativa e Doença de Crohn. O presente estudo sugere ainda uma possível alternativa ao tratamento e modulação das doenças inflamatórias intestinais em seres humanos, de tal forma que a bactéria em estudo, *L. lactis*, é capaz de auxiliar na remissão de sintomas e, conseqüentemente, fornecer maior qualidade de vida aos pacientes acometidos por estas doenças. Mais estudos experimentais são necessários para confirmar os achados.

Palavras-chave: Doença de Crohn; Retocolite Ulcerativa; Inflamação; Microbiota; Bactéria ácido láctica, *Lactococcus*.

ABSTRACT

RIZZI, Tamires. **Probiotic effect of *Lactococcus lactis* in the prevention and treatment of inflammatory bowel diseases in mice: a systematic review.** 2022. 58f. Masters Dissertation. Post Graduation Program. College of Nutrition. Federal University of Pelotas, Pelotas, 2022.

In Brazil, inflammatory bowel diseases affect approximately 10 to 27 individuals per 100 thousand inhabitants. These pathologies are caused by the interaction of genetic factors, microbiota, and intestinal mucosal immunoregulation. The beneficial effect of lactic acid bacteria as probiotics on the intestinal environment has been studied by many researchers since the active metabolites released by these probiotic bacteria in intestinal transit can permeate the intestinal layer to exert anti-inflammatory effects, and stabilize the mucus layer and help the intestinal epithelium to heal. Experimental and observational studies demonstrate that *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) bacteria can create and maintain an anti-inflammatory environment in the gastrointestinal tract and, thus, effectively reduce the onset of inflammation in diseases such as ulcerative colitis and Crohn's disease. So, the objective of the present study was to evaluate the probiotic effect of the lactic acid bacteria *L. lactis* in the prevention and treatment of inflammatory bowel diseases through a systematic review of the literature. The databases used were Cochrane Library and PubMed, and the descriptors used were *L. lactis*, Inflammatory bowel disease, Prevention, Treatment, Crohn's disease, Ulcerative Retocolitis, and Acid Lactic Bacteria. In total, 3.320 articles were found, of which only six were included in the review. According to the results, it is possible to suggest that this species of lactic acid bacteria can help in treating and treating intestinal modulation of animals with Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. The present study suggests a possible alternative to the treatment and modulation of inflammatory bowel diseases in humans in such a way that the bacterium under study, *L. lactis*, can able to assist in the remission of symptoms and, consequently, provide a better quality of life for patients affected by these diseases. More experimental studies are needed to confirm the findings.

Keywords: Crohn's disease; Ulcerative colitis; Inflammation; Microbiota; Lactic acid bacteria; *Lactococcus*.

LISTA DE FIGURAS

Artigo

Figura 1	Fluxograma gráfico da metodologia utilizada na seleção dos artigos a incluídos na revisão sistemática.....	42
Figura 2	Utilização de <i>Lactococcus lactis</i> como vetor de entrega nas doenças inflamatórias intestinais.....	48

LISTA DE TABELAS

Projeto

Tabela 1	Busca realizada na base de dados <i>Pubmed</i> de acordo com os descritores escolhidos.....	25
-----------------	---	----

Artigo

Tabela 1	Descrição detalhada de cada estudo incluído na revisão sistemática. (n=6).....	44
Tabela 2	Risco de viés dos ensaios clínicos randomizados incluídos e avaliados por meio de RoB 2.0.....	46

SUMÁRIO

Projeto de Dissertação	9
1. Introdução.....	10
2.1 Objetivo geral.....	12
2.2 Objetivos específicos	12
3. Revisão bibliográfica	13
3.1 Doença Inflamatória Intestinal (DII).....	13
3.2 Bactérias ácido lácticas	14
3.3 Probióticos	16
3.4 Ação dos probióticos na Doença Inflamatória Intestinal	17
3.5 Ação do <i>Lactococcus lactis</i> na Doença de Crohn.....	19
3.6 Ação do <i>Lactococcus lactis</i> na Retocolite Ulcerativa	20
3.7 Sistema de defesa e suplementação com probióticos	22
4. Métodos	24
4.1 Estratégia de busca	24
4.2. Critérios de elegibilidade.....	25
4.2.1 Critérios de exclusão.....	25
4.3 Desfecho.....	26
4.5 Seleção dos artigos.....	26
4.6 Divulgação dos resultados	26
5. Cronograma.....	27
6. Orçamento	28
7. Referências.....	29
Artigo de Dissertação	35
1. Introdução.....	39
2. Métodos	40
2.1 Fontes de dados e estratégia de pesquisa	40
2.2 Critérios de inclusão e exclusão	41
2.3 Seleção de estudos	41
2.4 Avaliação do risco de viés em estudos incluídos.....	41
3. Resultados.....	42
4. Discussão	50
5. Conclusão.....	53
6. Referências.....	53

Projeto de Dissertação

Associação do efeito probiótico de *Lactococcus lactis* na prevenção e no tratamento de doenças inflamatórias intestinais em camundongos: uma revisão sistemática

1. Introdução

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças inflamatórias crônicas recorrentes que incluem principalmente a Doença de Crohn e a Retocolite Ulcerativa, as quais apresentam características clínicas e patológicas sobrepostas e distintas (Halpin; Ford, 2012). De acordo com o Grupo de Estudos da Doença Inflamatória Intestinal do Brasil (GEBIID), esta patologia pode acometer até 27 por 100 mil indivíduos, sendo que essa taxa varia de acordo com as regiões do país, com maiores índices observados nas regiões Sul e Sudeste. As DII acometem principalmente jovens em fase produtiva, o pico de início da doença ocorre entre 15 e 30 anos de idade, com um segundo pico menos significativo entre os 50 e 70 anos. São mais prevalentes em indivíduos de raça caucasiana, que vivem em áreas urbanas e industrializadas e a distribuição entre os sexos é uniforme (Vilela et al., 2020).

Essas doenças são causadas pela interação entre fatores genéticos, microbiota e imunorregulação da mucosa intestinal. A Retocolite Ulcerativa compromete o reto e o cólon, enquanto a doença de Crohn pode comprometer qualquer parte do trato digestivo, da boca ao ânus, mas a região ileal e ileocecal são seus principais alvos. Especialistas sobre o assunto vêm tentando encontrar soluções e medidas para amenizar os sintomas (como dor abdominal, náuseas, cólicas e episódios diarreicos) e melhorar a qualidade de vida dos indivíduos que apresentam doenças intestinais. Dentre estas medidas, o uso de probióticos vem apresentando características promissoras na prevenção e tratamento, contribuindo para o bom prognóstico dessas doenças (Bai et al., 2006; Amer et al., 2018).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2001), os probióticos são organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro. Os probióticos podem auxiliar na saúde intestinal por meio da função de melhora na barreira epitelial intestinal, por modificação do pH, por efeitos imunomoduladores, por degradação de receptores de toxinas, assim como competição por nutrientes, produção de substâncias inibitórias de patógenos, bloqueio de sítios de adesão desses patógenos

e modulação da microbiota intestinal. Esses benefícios são conferidos por meio da exclusão competitiva de patógenos, produção de compostos antimicrobianos e competição por fatores de crescimento com determinadas bactérias (Bermudez-Brito et al., 2012; Bajaj, Amaral e Shibl, 2015; Claes e Lebeer, 2019).

Nesse sentido, o efeito benéfico das bactérias ácido lácticas (BAL), como probióticos no ambiente intestinal vem sendo estudado, especialmente no que diz respeito na diminuição da inflamação intestinal por neutralização de citocinas pró inflamatórias, redução de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), modulação da resposta imune, redução dos escores de atividade de doenças inflamatórias e diminuição de características patológicas do intestino grosso e delgado (Kim e Liu, 2002; Hanson et al., 2013; Gomes-Santos et al., 2017; Kosler et al., 2017).

Devido ao aumento do tônus supressor do microambiente intestinal em condições basais, os metabólitos ativos liberados pelas bactérias probióticas durante o trânsito intestinal, podem permear a camada intestinal para exercer efeitos anti-inflamatórios, estabilizar a camada de muco, auxiliar na cicatrização do epitélio e produzir ácidos graxos de cadeia curta, que atuam como protetores da mucosa (Ménard et al., 2004; Vandenbroucke et al., 2004; Saadatzadeh et al., 2012). Em DII parece haver melhora dos sintomas clínicos, diminuição nas alterações histológicas e na produção de muco, além de as BAL melhorarem significativamente o encurtamento do comprimento, pontuação histológica do cólon e exercerem efeito antioxidante (Nishitani et al., 2009; Ballal et al., 2015; Plaza-Díaz et al., 2017).

Especificamente *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) é capaz de criar e manter um ambiente anti-inflamatório no trato gastrointestinal e, assim, diminuir efetivamente o início da inflamação em diversos modelos de camundongos com DII, por meio da inibição da produção de Interferon-gama (IFN- γ), Interleucina 6 (IL-6) e TNF- α e aumento da produção de IL-10 no tecido colônico (Zurita-Tukr et al., 2020; Gomes-Santos et al., 2017).

O uso de BAL no tratamento dos sintomas na Doença de Crohn e na Retocolite Ulcerativa em humanos parece ser promissor (Bai et al., 2006; Ballal et al., 2015; Spaiser et al., 2015), entretanto, ainda não são encontrados na literatura estudos de revisão sistemática que demonstrem a associação do efeito benéfico de *L. lactis* no tratamento, na prevenção e na remissão das DII. Além disso, há necessidade da

realização de um estudo mais aprofundado, por meio de metodologias, critérios específicos e análise quantitativa dos resultados, acerca deste tema.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito probiótico da bactéria ácido láctica *L. lactis* na prevenção e no tratamento de doenças inflamatórias intestinais por meio de uma revisão sistemática da literatura.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o efeito dos probióticos na prevenção e tratamento das doenças inflamatórias intestinais;
- b) Analisar a ação de *L. lactis* na prevenção e tratamento da Doença de Crohn;
- c) Analisar a ação de *L. lactis* na prevenção e tratamento da Retocolite Ulcerativa.

3. Revisão bibliográfica

3.1 Doença Inflamatória Intestinal (DII)

De acordo com a Classificação Internacional de Doenças (CID) instituída pela Organização Mundial da Saúde (OMS), as DII são um grupo de condições inflamatórias do intestino de etiologia desconhecida, sendo que a Doença de Crohn e a Retocolite Ulcerativa são as mais comuns. A patogênese hipotetizada é que o sistema imunológico da mucosa intestinal em indivíduos geneticamente suscetíveis mostra uma resposta anômala no lúmen intestinal para determinados antígenos (como fatores dietéticos e bactérias da microbiota intestinal).

Tanto a Doença de Crohn como a Retocolite Ulcerativa são patologias que se manifestam em regiões do trato gastrointestinal as quais contém altas concentrações bacterianas (ex.: íleo, cólon e reto), tornando o meio propício ao desenvolvimento das DII, uma vez que o desequilíbrio microbiano ou disbiose está comumente associado a essas doenças (Thompson-Chagoyán et al., 2007). Esta alta concentração bacteriana em pacientes com DII é caracterizada pela diminuição do número de BAL e bifidobactérias e pelo aumento do número de *Escherichia coli*, coliformes e bacteroides no cólon. A nutrição adequada e equilibrada parece desempenhar um papel causal tanto na Retocolite Ulcerativa quanto na Doença de Crohn (Kanai et al., 2014).

Segundo Bermudez-Brito et al. (2012), uma ligação entre os níveis alterados de citocinas pró-inflamatórias e a permeabilidade intestinal foi descrita em uma série de doenças intestinais. Os autores enfatizam que os probióticos podem contribuir para o reforço da barreira da mucosa epitelial intestinal, de modo a auxiliar na prevenção do dano epitelial induzido por citocinas nas DII.

Com relação à patogênese das DII, o TNF- α exerce um papel central. Segundo Gomes-Santos (2012), este marcador inflamatório é encontrado em grande escala em camundongos com retocolite, portanto, a inibição da secreção de TNF- α na mucosa intestinal inflamada em indivíduos com Retocolite Ulcerativa é o principal alvo para o tratamento da doença e para a prevenção de recidivas sintomáticas, que geralmente apresentam alterações nos marcadores clínicos, genéticos, endoscópicos, histológicos, sorológicos e fecais (Liverani et al., 2016). Da mesma forma, Cui et al. (2004) sugerem que os probióticos podem bloquear a ativação do fator de transcrição

NF-KappaB, diminuir a expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 beta (IL-1 β) e aumentar a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10.

3.2 Bactérias ácido lácticas

Bactérias ácido lácticas são caracterizadas como como cocos ou bacilos Gram-positivos, catalase e oxidase negativa, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, produtores de ácido láctico devido a fermentação de açúcares, facilmente encontrados em diferentes produtos alimentares fermentados, a exemplo dos derivados lácteos, contribuindo para o desenvolvimento de características sensoriais diferenciais desses produtos (Forsythe, 2013; Cavanagh et al., 2014). Este grupo de bactérias é assim denominado por produzirem, entre outros compostos, o ácido láctico como produto principal de seu metabolismo, a partir da degradação de carboidratos, como por exemplo, a lactose. As descobertas acerca da elaboração de produtos a partir de BAL podem auxiliar na escolha da matriz alimentar a fim de otimizar o fornecimento de probióticos, de acordo com a sua viabilidade, estabilidade e capacidade de cultivo em escala industrial (Daniel et al., 2015).

Os gêneros que compõem esse grupo de micro-organismos são *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Tetragenococcus*, *Lactosphaera*, *Vagococcus*, *Leuconostoc* e *Weissella* (Portner, Faschian e Goelling, 2016).

De acordo com Beshkova e Frengova (2012), BAL são conhecidas também pela sua capacidade de produzirem bacteriocinas (especialmente a nisina - produzida por *L. lactis*) com atividade antimicrobiana. Esse aspecto faz com que estas atuem como micro-organismos bioconservadores, pois atuam inibindo os micro-organismos patogênicos. Por este motivo, satisfazem os requisitos de relevância tecnológica, assegurando a qualidade dos produtos alimentícios, além de beneficiar a saúde do consumidor.

O impacto de cepas de BAL no hospedeiro humano tem sido extensivamente estudado, pois o potencial probiótico destas torna-as atraentes para a utilização no desenvolvimento de alimentos funcionais (Quinto et al., 2014). Assim, é de grande interesse o estudo de micro-organismos com atividade probiótica oriundos de BAL, como por exemplo, adesão efetiva ao trato gastrointestinal, produção de metabólitos e tolerância ao estresse (Daniel et al., 2015).

Os efeitos benéficos de BAL são cepa dependente. A concentração mínima para consumo de BAL com potencial probiótico varia conforme o órgão de orientação. A Food and Agriculture Organization (FAO) recomenda um mínimo de 10^6 log Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama de alimento diariamente (FAO, 2002); já a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda uma concentração maior de 10^8 ou 10^9 log UFC na porção de produto (100 g) pronto para consumo (ANVISA, 2008). Para a produção destes produtos, geralmente, são utilizados micro-organismos como *L. lactis*, *Lactobacillus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium* e *Leuconostoc*, os quais são considerados como culturas iniciadoras ou “*starter*” (Akbar et al., 2019). Segundo Holzapfel (2000) a cultura iniciadora ou “*starter*” pode ser definida como um preparado de material contendo um grande número de micro-organismos viáveis que quando adicionado ao material cru será responsável pelo aumento na velocidade de fermentação do produto alimentício, controle da fase inicial de fermentação e ainda, preservação do produto.

Uma grande variedade de produtos lácteos com diferentes características pode ser obtida utilizando diferentes tecnologias de fabricação e culturas *starters* ou iniciadoras. Dentre estas, estão as BAL as quais são capazes de converter açúcares, ácido orgânicos, proteínas ou gorduras em componentes de sabor e de aroma característicos, melhorando a textura e a viscosidade de produtos fermentados por meio da produção de exopolissacarídeos (EPS) (De Vuyst; Degeest, 1999; Ruas-Madiedo; Hugenholtz; Zoon, 2002).

O uso de culturas *starters*, produtoras de EPS, como *S. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* é uma prática comum na produção de produtos fermentados, como exemplo, na produção de iogurte, para melhorar a textura, evitando a sinérese e aumentando a viscosidade do produto. Tanto as BAL mesófilas (*Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. sakei*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, etc.) quanto as termófilas (*S. thermophilus*, *S. macedonicus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, etc.) são capazes de sintetizar EPS (Torino, Mozzi e Valdez, 2005).

Segundo Korcz e Varga (2018), BAL são potencialmente capazes de produzir diferentes EPS, os quais apresentam potencial para interferir na microbiota gastrointestinal, pois são secretados ou ligados à parede celular bacteriana, agindo

como ligantes ou auxiliando na adesão de bactérias benéficas por meio das adesinas da superfície celular.

Ainda de acordo com Korcz e Varga (2018), como as fibras alimentares compreendem um grupo complexo de substâncias com estruturas, propriedades e impactos notavelmente diversificados, o EPS mostra uma infinidade de efeitos benéficos à saúde como, aumento das funções imunológicas, com proliferação de linfócitos T, ativação de macrófagos e indução de citocinas (IFN- γ e IL- 1A).

Deve-se destacar que *L. lactis* é considerado um micro-organismo seguro para utilização em matrizes alimentares, segundo a Food and Drug Administration (FDA) (Song et al., 2017). O papel predominante de *L. lactis* como cultura iniciadora em laticínios é produzir ácido láctico a uma concentração satisfatória (~2%) para contribuir com a lise das proteínas do leite durante a fermentação, o que beneficia o produto final em termos sensoriais (Cavanagh et al., 2014).

3.3 Probióticos

De acordo com a FAO (2001) probióticos são definidos como "micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro". Os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os micro-organismos probióticos mais utilizados como suplemento na alimentação humana (Quinto et al., 2014).

Os principais mecanismos dos probióticos que beneficiam a saúde do hospedeiro incluem melhora na função da barreira epitelial intestinal, efeitos imunomoduladores, degradação de receptores de toxinas, competição por nutrientes por meio de exclusão competitiva e produção de substâncias inibitórias de micro-organismos patogênicos, além de bloqueio de sítios de adesão destes e modulação da microbiota intestinal (Bajaj, Claes e Lebeer, 2019).

Segundo Amaral e Shibl, (2015) os probióticos podem auxiliar na modificação do pH do intestino, antagonizar o crescimento de patógenos pela produção de compostos antimicrobianos, competir com os patógenos por ligação em receptores locais, bem como por nutrientes disponíveis e fatores de crescimento. De acordo com estudo de Chung et al. (2008), algumas BAL, como *L. casei*, são capazes de regular a expressão de múltiplas citocinas inflamatórias, aumentando ou diminuindo sua expressão. Além disso, essas bactérias possuem capacidade de reduzir a infiltração

neutrófila em circunstâncias de sinalização incompleta de receptor do tipo *toll-like 4* (TLR-4), de forma que os níveis de atividade de mieloperoxidase e interleucina são atenuados em camundongos TLR-4 pré-tratados, demonstrando efeito preventivo dos probióticos na retocolite em sua fase aguda.

3.4 Ação dos probióticos na Doença Inflamatória Intestinal

Uma estratégia estabelecida no tratamento da DII é a neutralização de citocinas pró-inflamatórias. Kosler et al. (2017) demonstraram capacidade de *L. lactis* em remover as citocinas por meio de um efeito sinérgico de ligação entre estas bactérias e as IL-17A e IL-23 e TNF- α . Uma cepa bacteriana probiótica específica pode melhorar o ambiente intestinal, facilitando as funções de barreira epitelial intestinal e inibindo a inflamação da mucosa.

Bermudez-Brito et al. (2012) realizou uma revisão sistemática para explorar os modos de ação dos probióticos, com foco em como os micro-organismos intestinais podem influenciar no hospedeiro. Entre os vários mecanismos, os pesquisadores descreveram a modificação da microbiota intestinal, adesão competitiva à mucosa e epitélio intestinal, fortalecimento da barreira epitelial intestinal e modulação do sistema imunológico.

Saez-lara et al. (2015) sistematizaram uma revisão de ensaios clínicos realizados em humanos com probióticos e/ou simbióticos contendo BAL no tratamento da Doença de Crohn e na Retocolite Ulcerativa. Os resultados demonstraram que os probióticos foram efetivos no tratamento e remissão da Retocolite Ulcerativa, enquanto que na Doença de Crohn a eficácia clara foi demonstrada apenas quando administrado simbióticos. Além disso, demonstraram melhora clínica de sintomas para patologias como bolsite e colangite, associadas as DII.

Estudos demonstram que BAL podem contribuir para a microbiota saudável e com menor potencial inflamatório. No estudo de Spaiser et al. (2015), os quais administraram uma dose de probióticos contendo BAL em idosos, demonstraram que houve mudança no perfil microbiano dessa população, pois o probiótico produziu um perfil de citocinas com menor potencial inflamatório. Gomes-Santos (2012) demonstram que camundongos deficientes em IL-10 apresentaram inflamação progressiva e espontânea com alterações marcantes no sistema imunológico.

Os efeitos dos probióticos na remissão das DII, por meio da mudança da composição da microbiota intestinal, já havia sido relatado na revisão sistemática de Santos (2017), sendo que o gênero *Lactobacillus* foi o que apresentou melhores resultados como melhora no quadro clínico e na resposta inflamatória, seguido de *Bifidobacteria* e *Streptococcus*. A administração oral de *L. lactis* recombinante contendo anticorpos TNF- α demonstrou melhora nos parâmetros histológicos e macroscópicos da retocolite em camundongos (Chiabai, 2019). Além disso, os animais tratados apresentaram níveis dos transcritos de mRNA de IL-6, IL17A, IL1B, IL10 e Foxp3 semelhantes aos animais saudáveis.

Ménard et al. (2004) apresentaram aspectos importantes das BAL no tratamento das DII, demonstrando efeito benéfico destas na homeostase intestinal. Em teste *in vitro* realizado por meio de inflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS), *B. breve* e *S. thermophilus*, apresentaram significativa capacidade de inibição do TNF- α que permeiam a barreira intestinal. Os resultados sugeriram que os metabólitos ativos liberados pelas bactérias probióticas durante o trânsito intestinal, podem permear a camada intestinal para exercer efeitos anti-inflamatórios. Isso aumentaria o tônus supressor do microambiente intestinal em condições basais, auxiliando na redução da inflamação em condições patológicas. O ácido linoleico conjugado (CLA) possui funções estimuladoras do sistema imunológico e pode ser utilizado no tratamento e prevenção de DII, como a Doença de Crohn, pois regula positivamente a expressão do proliferador de peroxissoma colônico (PPAR-gama (γ)) no cólon, estimulando, desta forma, a produção de outros metabólitos anti-inflamatórios capazes de suprimir a retocolite (Bassaganya-Riera et al., 2012; Kuhl e Linder, 2016). Segundo Kim e Liu (2002) *L. lactis* foi o que produziu maior quantidade de CLA em leite fermentado entre as bactérias selecionadas, sendo que 14 espécies de BAL foram testadas quanto à capacidade de produção de CLA usando óleo de girassol contendo 70% de ácido linoléico como substrato. Em uma revisão de ensaios clínicos randomizados *in vitro*, com animais e humanos, realizada por Plaza-díaz et al. (2017), o efeito anti-inflamatório de BAL no tratamento das DII foi demonstrado. Por intermédio principalmente dos receptores *toll-like* (receptores de reconhecimento de padrões que identificam uma ampla gama de componentes microbianos), houve significativa redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias no microbioma

intestinal dos participantes dos estudos selecionados. Por este motivo, houve melhora nos sintomas clínicos, nas alterações histológicas e na produção de muco.

Vandenbroucke et al. (2004) encontraram uma nova abordagem terapêutica de tratamento da retocolite (na fase aguda e na fase crônica) e diminuição no dano epitelial intestinal que envolve a secreção por *L. lactis in situ* de *trefoil factors* (TFF). As TFF são proteínas secretoras estáveis expressas na mucosa gastrointestinal, que podem impedir a entrada de patógenos no organismo por meio da mucosa intestinal (função citoprotetora), estabilizar a camada de muco e auxiliar na cicatrização do epitélio, atuando na prevenção e tratamento da retocolite.

Os mecanismos de sinalização, por meio do qual as TFF agem, ainda são desconhecidos, porém há evidências crescentes de que a ativação da prostaglandina endoperóxido sintetase (também conhecida como ciclooxi-genase 2) por TFF, leva à indução de síntese de prostaglandinas, um determinante importante de suas propriedades citoprotetivas (Vandenbroucke et al., 2004).

As TFF desempenham papéis importantes na proteção e reparo de superfícies epiteliais, incluindo o trato gastrointestinal devido às suas propriedades anti-apoptóticas, as quais realizam a restituição do epitélio intestinal, e também, devido a sua interação com mucinas. A combinação de mucinas e TFF demonstrou aumentar a viscosidade do muco e reduzir a permeabilidade do epitélio intestinal por induzirem a migração de células até o intestino inflamado (Tan et al., 1999; Aamann et al., 2014). Além disso, por ativarem a prostaglandina endoperóxido sintetase e o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), essas proteínas têm ligação com a angiogênese, pois a fase de cicatrização e de recuperação das células do epitélio intestinal é dependente da sinalização dessa enzima e da ativação desse receptor (Aamann et al., 2014).

3.5 Ação do *Lactococcus lactis* na Doença de Crohn

A secreção de IL-10 por *L. lactis* geneticamente modificado, fornece uma abordagem terapêutica para a DII. Para avaliar a capacidade terapêutica na prevenção do início da enterocolite, Zurita-turk et al. (2020) administrou em camundongos com duas semanas de idade uma cepa invasiva de *L. lactis* por seis semanas consecutivas. O intuito do experimento é que esta cepa fosse capaz de entregar, diretamente às células hospedeiras IL-10, que é uma das citocinas anti-

inflamatórias mais importantes da resposta imune. Os resultados deste estudo demonstraram que a cepa diminuiu a inflamação em dois modelos de ratos induzidos a inflamação intestinal. Além disso, no mesmo estudo, observou-se uma redução no desenvolvimento da doença em seu estágio mais grave, pois os animais apresentaram menores escores de macroscopia e danos histológicos intestinais, além do aumento dos níveis de IL-10 e forte tendência a reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias.

De acordo com Saraiva (2015), as DII caracterizam-se por extensa inflamação devido à desregulação do sistema imune inato e adaptativo cuja etiologia ainda não é completamente compreendida e a cura ainda não foi encontrada, portanto a busca por novas moléculas capazes de controlar a DII e sua entrega ao local da inflamação são o objetivo de muitos pesquisadores. De acordo com os resultados deste estudo, a utilização de *L. lactis* como veículo de entrega de moléculas terapêuticas e/ou profiláticas diretamente à superfície da mucosa representa uma abordagem eficaz para o tratamento de doenças associadas ao sistema digestivo, pois estas apresentam potencial para reduzir a dose terapêutica, facilitam a entrega ao TGI, além de evitar possíveis efeitos colaterais que advém da administração sistêmica. Além disso, também deve-se considerar o fato de que não apresentam riscos de reversão de patogenicidade, especialmente em crianças e pacientes imunocomprometidos (Dunham, 2002). Assim, a maior vantagem do uso dessa bactéria como vetor vivo para entrega reside no fato de ser segura, não invasiva e não patogênica. Diversos sistemas de expressão e de endereçamento celular em diferentes localizações celulares foram desenvolvidos não só para uso em *L. lactis*, mas também em outras BAL.

Braat et al. (2006) trataram 10 pacientes com Doença de Crohn com *L. lactis* geneticamente modificado no qual o gene da timidilato sintetase foi substituído por uma sequência assintética que codifica a IL-10 humana. A modificação foi realizada no intuito de estimular a liberação dessas proteínas pela mucosa e assim, foi observada uma diminuição da atividade da Doença de Crohn.

3.6 Ação do *Lactococcus lactis* na Retocolite Ulcerativa

A eficácia do probiótico *L. lactis* vem sendo estudada extensivamente ao longo dos anos. A administração oral de *L. lactis* com IL-7 recombinante foi testada por

Hanson et al. (2014). Os pesquisadores induziram retocolite em camundongo a partir da transferência de células T-CD4, que levam a inflamação intestinal. Por meio deste estudo foram observados diminuição dos escores de atividade da doença, além de redução nas características patológicas do intestino grosso e delgado e significativa redução nos níveis de citocinas inflamatórias no tecido colônico, como a expressão gênica de IL-1A, IL-6, IFN- γ e IL-23.

As proteínas de choque térmico (Hsps) são moléculas responsivas ao estresse envolvidas em vários processos fisiopatológicos. Várias linhas de evidência ligam a expressão de Hsps ao desenvolvimento e prognóstico de DII. Por serem antígenos ubíquos e imunodominantes, são moléculas muito utilizadas na terapia de tolerância oral, que nada mais é do que a administração de antígenos via oral, que vêm sendo muito utilizados no tratamento de doenças crônicas e autoimunes no intuito de prevenir a progressão dessas doenças devido a sua função citoprotetiva (Hoter e Naim, 2019). Gomes-Santos et al. (2017) demonstraram que o pré-tratamento oral com *L. lactis* geneticamente modificado produz e libera *Mycobacterium* Hsp65, o qual preveniu completamente a retocolite induzida por dextrano sulfato de sódio (DSS) em camundongos. A proteção foi associada à redução de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-6 e TNF- α e aumento da produção de IL-10 no tecido colônico.

No mesmo sentido de promover o aumento de citocinas anti-inflamatórias no epitélio intestinal, Foligne et al. (2007) modificaram geneticamente a bactéria *L. lactis* para secretar a proteína LcrV da espécie enteropatogênica *Yersinia pseudotuberculosis* e observaram que a mesma é capaz de estimular a síntese da IL-10 e evitar a ativação de citocinas pró-inflamatórias. O antígeno V (LcrV) é sintetizado pelo patógeno *Y. pestis*, o qual participa da evasão bacteriana da resposta imune inata do hospedeiro. A administração de *L. lactis* geneticamente modificada para secreção de LcrV, se mostrou eficaz na prevenção e no tratamento da retocolite aguda induzida por DSS. No mesmo estudo, a administração de *L. lactis* também foi eficaz no tratamento da retocolite induzida por ácido trinitrobenzenossulfônico, pois levou a indução de IL-10, por meio de uma via dependente do receptor 2 do tipo *toll*. Portanto, a utilização de moléculas imunomoduladoras, por meio de BAL como veículo, também demonstra-se como uma nova terapêutica para DII.

3.7 Sistema de defesa e suplementação com probióticos

No intestino humano os micro-organismos agem em simbiose para modular diferentes funções, como estimulação e regulação da imunidade epitelial inata, exclusão competitiva de patógenos e produção de metabólitos importantes - carboidratos, vitaminas e ácidos graxos de cadeia curta (Saez-lara, 2015).

Alguns dos mecanismos propostos pelos quais os probióticos exercem efeitos benéficos são a produção de ácidos graxos de cadeia curta e lactato, o aumento do tempo de trânsito intestinal (que influencia na aderência da bactéria à parede intestinal) e redução da produção de substâncias nocivas as quais podem contribuir para a patogênese da DII (Saadatzadeh et al., 2012).

No processo de inflamação, as espécies reativas de oxigênio (ERO) causam danos ao epitélio intestinal. Ballal et al. (2015), em estudo utilizando análises genômicas comparativas, identificaram o *L. lactis* como possível veículo promissor para superóxido dismutase (SOD), a qual atua como antioxidante na desintoxicação de ERO. Isso ocorre, pois essa bactéria está envolvida na redução de oxigênio intracelular durante a respiração das células, diminuindo o dano oxidativo. Desta forma, os probióticos podem ser atenuantes da inflamação nas DII.

Há também evidências recentes sugerindo que certas vitaminas podem fornecer efeitos anti-inflamatórios e que certas cepas de BAL podem produzir formas biologicamente ativas de vitaminas. Os probióticos podem ser usados para diminuir a inflamação e fornecer ao hospedeiro nutrientes essenciais que normalmente são deficientes em pacientes com DII devido a morfologias intestinais alteradas (LeBlanc, 2018).

De acordo com Amer et al. (2018), muitas espécies de micro-organismos probióticos (como espécies de *Bifidobacterium*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces boulardii*, espécies de *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Pediococcus*) mostraram efeitos benéficos no hospedeiro por meio de diferentes mecanismos envolvendo produção de proteínas, inibidores de sinalização *quorum sensing* (através da secreção de moléculas que bloqueiam a comunicação entre as bactérias patogênicas), imunoglobulina A e ácidos graxos de cadeia curta; diminuição da produção de TNF- α e IL-8; aumento da expressão de mucina 2 e aumento da regulação positiva de defensina.

Hegazy e El-Bedewy (2010) publicaram um estudo com 30 pacientes acometidos com Retocolite Ulcerativa no estágio leve a moderado sendo estes divididos em dois grupos: Grupo I: administrado sulfasalazina numa dose 2400 mg/dia; e Grupo II: administração concomitante de sulfasalazina (2400 mg/dia) e o composto probiótico (*L. delbruekii* + *L. fermentum*) numa dose de 10^{10} de UFC, cujo objetivo foi comprovar o efeito terapêutico do composto probiótico, além de verificar o seu efeito nos mediadores inflamatórios. Neste estudo, os autores verificaram ao final de oito semanas que o grupo II (sulfasalazina + probiótico) apresentava inflamação com menor extensão, possivelmente pela prevenção de danos na mucosa e alívio da retocolite, além de diminuição da atividade da mieloperoxidase, o que é extremamente relevante considerando que o recrutamento de neutrófilos encontra-se intimamente ligado à concentração da mieloperoxidase (Simeoli et al., 2015).

Nishitani et al. (2009) demonstraram que a inibição de citocinas pró-inflamatórias pela ingestão de *L. lactis* subsp. *cremoris* FC foi acompanhada por supressão significativa da inflamação intestinal induzida em camundongos e também em células *in vitro*. A administração de *L. lactis* subsp. *cremoris* FC diminuiu significativamente o encurtamento do comprimento do cólon característico das DII e também diminuiu sua pontuação histológica. No mesmo estudo, a expressão de mRNA anômalo em tecido inflamado próximo ao nível de controle, foi alcançada por meio de uma supressão importante de TNF- α , IFN- γ , IL-6, óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e da expressão de mRNA de MIP-2. Além disso, sua ingestão resultou na regulação negativa da expressão de mRNA de IL-8 e na inibição da trans-localização nuclear de NF- κ B *in vitro*. Tendo em vista que a retocolite é caracterizada pelo acúmulo de células inflamatórias e, principalmente, pela expressão aumentada de citocinas derivadas de macrófagos, concluíram que a administração de *L. lactis* é uma possível alternativa terapêutica no tratamento das DII.

4. Métodos

Será conduzida uma revisão sistemática da literatura para avaliar a relação entre *L. lactis* como probiótico utilizado na remissão e tratamento de DII.

4.1 Estratégia de busca

Para esta pesquisa foram consultadas as seguintes bases de dados: *PubMed*, *Science Direct*, *Scopus*, LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), Google Scholar, Portal de Periódicos CAPES e *Web of Science*. Após a realização de alguns testes na base de dados *PubMed*, os seguintes descritores foram escolhidos: Inflammatory bowel disease; Ulcerative colitis; Crohn's disease; *Lactococcus lactis*; Probiotics; Acid lactic bacteria; Prevention; Treatment. A busca nas bases de dados foi realizada com os seguintes limites: estudos conduzidos em animais e manuscritos com descritor no título e/ou resumo. A Tabela 1 apresenta os testes realizados na base de dados *PubMed*, com os descritores escolhidos combinados de diferentes formas.

Tabela 1. Busca realizada na base de dados Pubmed de acordo com os descritores escolhidos.

Buscas	Resultados
<i>Lactococcus lactis</i> AND ulcerative colitis	17
Inflammatory bowel disease AND <i>Lactic acid bacteria</i>	763
Inflammatory bowel disease AND <i>Lactococcus lactis</i>	87
Probiotic AND Crohn's disease OR ulcerative colitis	49.815
Lactic acid bacteria AND ulcerative colitis OR Crohn's disease	49.815
<i>Lactococcus lactis</i> AND ulcerative colitis OR Crohn's disease	71
Inflammatory bowel disease AND prevention AND <i>Lactococcus lactis</i>	36
Inflammatory bowel disease AND treatment AND <i>Lactococcus Lactis</i>	81
Inflammatory bowel disease AND treatment AND acid lactic bacteria	124
Inflammatory bowel disease AND prevention AND acid lactic bacteria	76
Crohn's disease AND prevention AND <i>Lactococcus lactis</i>	9
Ulcerative retocolitis AND prevention AND <i>Lactococcus lactis</i>	12

4.2. Critérios de elegibilidade

Foram incluídos estudos originais com delineamento experimental, desde que avaliassem o efeito do uso de probiótico oriundo da BAL *L. lactis* na remissão e no tratamento de DII. As referências citadas nos artigos também foram avaliadas e, caso não fossem encontradas pela busca, eram incluídas na revisão.

4.2.1 Critérios de exclusão

Os artigos foram excluídos de acordo com os seguintes critérios: 1) estudos qualitativos; 2) incluíssem alguma outra BAL que não *L. lactis*; 3) não avaliassem as DII.

4.3 Desfecho

O desfecho em estudo são as DII: Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa.

4.4 Exposição principal

A exposição principal foi o uso do probiótico a partir de *L. lactis* por meio da suplementação dessa bactéria.

4.5 Seleção dos artigos

Para a etapa de seleção dos artigos, utilizou-se a ferramenta Endnote, sendo esta etapa realizada por duas pessoas independentes (autora do projeto de Dissertação e outra pessoa qualificada para essa função).

Considerando o planejamento da revisão, a intenção foi extrair as seguintes informações: autores; ano de publicação; país de realização do estudo; aspectos metodológicos (tipo de delineamento e características da amostra do estudo); operacionalização do desfecho e da exposição; medida de ocorrência e de efeito utilizadas e os principais resultados encontrados.

4.6 Divulgação dos resultados

Os resultados oriundos deste projeto de pesquisa serão: um volume final de Dissertação e um artigo científico a ser publicado em periódico de elevado impacto.

5. Cronograma

Etapas	Ago/Dez	Mar/Jul	Ago/Dez	Mar/Jun	Jul/Ago
	--2019--	--2020--		--2021--	
Revisão bibliográfica					
Elaboração do projeto de pesquisa					
Seleção dos artigos e análise estatística					
Redação da Dissertação final					
Defesa					

6. Orçamento

As ferramentas utilizadas neste estudo serão gratuitas e de propriedade da autora, portanto, não haverá custos na realização do projeto.

7. Referências

- AAMANN, L., VESTERGAARD, E.M., GRØNBÆK, H. Trefoil factors in inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 12, p. 3223, 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Probióticos: Probióticos: construção da lista de linhagens probióticas, [s. l.], p. 1–14, 2017.
- AKBAR, A. et al. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from fermented milk products and its antimicrobial potential. **CyTA - Journal of Food**, v. 17, n. 1, p. 214-220, 2019.
- AMARAL, A. A., SHIBL A. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. **Saudi Pharmaceutical Journal**. v. 23 n. 2. p. 107-114, 2004.
- AMER, M., NADEEM, M., NAZIR, SUR, FAKHAR, M., ABID, F., AIN, Q-U & ASIF, E., Probiotics and Their Use in Inflammatory Bowel Disease, **Alternative therapies in health and medicine**, v. 24, n. 3, p. 16–23, 2018.
- BAI A.-P., OUYANG Q., XIAO X.-R., LI S.-F. Probiotics modulate inflammatory cytokine secretion from inflamed mucosa in active ulcerative colitis. **International Journal of Clinical Practice**. v. 3. p. 284–288, 2006.
- BAJAJ, B. K., CLAES, I. JJ, LEBEER, S. Functional mechanisms of probiotics. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, v. 2019, p. 321-327, 2019.
- BALLAL S.A., VEIGA P., FENN K., et al. Host lysozyme-mediated lysis of *Lactococcus lactis* facilitates delivery of colitis-attenuating superoxide dismutase to inflamed colons. **Proceedings of the National Academic Sciences U S A**. v. 112, n. 25, p.7803-7808, 2015.
- BASSAGANYA-RIERA J., HONTECILLAS R., HORNE W.T., SANDRIDGE M., HERFARTH H.H., BLOOMFELD R., ISAACS K.L. Conjugated linoleic acid modulates immune responses in patients with mild to moderately active Crohn's disease. **Clinical Nutrition**. v. 31, p. 721–727, 2012.
- BERMUDEZ-BRITO M., PLAZA-DÍAZ J., MUÑOZ-QUEZADA S., GÓMEZ-LLORENTE C., GIL A. Probiotic mechanisms of action. **Annals of Nutrition and Metabolism**. v. 61, n. 2, p. 160-174, 2012.
- BESHKOVA, D., FRENGOVA, G. Bacteriocins from lactic acid bacteria: microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 4, p. 419-432, 2012.

CAVANAGH, D., FITZGERALD, G. F., & MCAULIFFE, O. From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. **Food Microbiology**, v. 47, p. 45–61, 2015.

CHIABAI, Maria José. **Avaliação dos efeitos anti-inflamatórios de anticorpos recombinantes, produzidos por meio de um sistema de entrega de dna tendo a bactéria *Lactococcus lactis* como veículo, no tratamento da colite experimental.** Tese (Biologia Molecular), Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

CHUNG, Y. W. et al. *Lactobacillus casei* prevents the development of dextran sulphate sodium-induced colitis in Toll-like receptor 4 mutant mice. **Clinical and experimental immunology**. v. 151, n. 1, p. 182-189, 2008.

CUI H.H., CHEN C.L., WANG J.D., et al. Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. **World Journal of Gastroenterology**. v. 10, n. 10. p.1521–1525, 2004.

DANIEL, C. et al. Dual-color bioluminescence imaging for simultaneous monitoring of the intestinal persistence of *Lactobacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* in living mice. **Applied and Environmental Microbiology**., v. 81, n. 16, p. 5344-5349, 2015.

DE MORENO DE LEBLANC A., LEVIT R., DE GIORI G.S., LEBLANC J.G. Vitamin Producing Lactic Acid Bacteria as Complementary Treatments for Intestinal Inflammation. **Anti-inflammatory & Anti-allergy Agents in Medicinal Chemistry**. v. 17, n. 1. p. 50-56, 2018.

DUNHAM, Stephen P. The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine. **Research in veterinary science**, v. 73, n. 1, p. 9-16, 2002.

FAO. The State of Food and Agriculture 2001. Food & Agriculture Org., 2001.

FOLIGNE B., DESSEIN R., MARCEAU M., POIRET S., CHAMAILLARD M., POT B., SIMONET M., DANIEL C. Prevention and treatment of colitis with *Lactococcus lactis* secreting the immunomodulatory *Yersinia* LcrV protein. **Gastroenterology**. v. 133, n. 3, p. 862-74, 2007.

FORSYTHE, S.J. Microbiologia da Segurança dos Alimentos. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

GOMES-SANTOS A.C., OLIVEIRA R.P., MOREIRA T.G., CASTRO-JUNIOR A.B., HORTA B.C., LEMOS L., ALMEIDA L.A., REZENDE R.M., CARA D.C., OLIVEIRA S.C., AZEVEDO V.A., MIYOSHI A., FARIA A.M. Hsp65-Producing *Lactococcus lactis*

Prevents Inflammatory Intestinal Disease in Mice by IL-10- and TLR2-Dependent Pathways. **Frontiers in Immunology**. v. 8, p. 30, 2017.

GOMES-SANTOS, ANA CRISTINA et al. New insights into the immunological changes in IL-10-deficient mice during the course of spontaneous inflammation in the gut mucosa. **Clinical & developmental immunology** v. 2012, 2012.

HALPIN, S.J., FORD, A.C. Prevalence of symptoms meeting criteria for irritable bowel syndrome in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. **American Journal of Gastroenterology**, v. 107, n. 10, p. 1474–1482, 2012.

HANSON M.L., HIXON J.A., LI W., et al. Oral delivery of IL-27 recombinant bacteria attenuates immune colitis in mice. **Gastroenterology**. v.146, n. 1. p. 210-221, e13, 2014.

HEGAZY S.K., EL-BEDEWY M.M. Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF-kappaB activation in ulcerative colitis. **World Journal of Gastroenterology**. v. 33, p. 4145-4151, 2010.

HOLZAPFEL, W. H. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. **International journal of food microbiology**, v. 75, n. 3, p. 197-212, 2002.

HOTER, A.; NAIM, H. Y. The Functions and Therapeutic Potential of Heat Shock Proteins in Inflammatory Bowel Disease—An Update. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 21, p. 5331, 2019.

KANAI T., MATSUOKA K., NAGANUMA M., HAYASHI A., HISAMATSU T. Diet, microbiota, and inflammatory bowel disease: lessons from Japanese foods. **The Korean Journal of Internal Medicine**.v. 29, n. 4. p. 409–415, 2014.

KIM, Y. J.; LIU, R. H. Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 5, p. 1731-1737, 2002.

KORCZ, E., KERÉNYI, Z., VARGA, L. Dietary fibers, prebiotics, and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: potential health benefits with special regard to cholesterol-lowering effects. **Food & function**, v. 9, n. 6, p. 3057-3068, 2018.

KOSLER S., STRUKELJ B., BERLEC A. Lactic Acid Bacteria with Concomitant IL-17, IL-23 and TNF α - Binding Ability for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. v.18, n. 4, p. 318-326, 2017.

KUHL, G. C., DE DEA LINDNER, J. Biohydrogenation of Linoleic Acid by Lactic Acid Bacteria for the Production of Functional Cultured Dairy Products: A Review. **Foods (Basel, Switzerland)**. v. 5, n. 1, p. 13, 2016.

LIVERANI E., SCAIOLI E., DIGBY R.J., BELLANOVA M., BELLUZZI A. How to predict clinical relapse in inflammatory bowel disease patients. **World Journal of Gastroenterology**. v. 22, n. 3, p. 1017-1033, 2016.

MÉNARD S., CANDALH C., BAMBOU J.C., TERPEND K., CERF-BENSUSSAN N., HEYMAN M. Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. **Gut**. v. 53, n. 6, p. 821-828, 2004.

NISHITANI Y., TANOUE T., YAMADA K., et al. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. **International Immunopharmacology**. v. 9, n 12, p. 1444-1451, 2009.

PLAZA-DÍAZ J., RUIZ-OJEDA F.J., VILCHEZ-PADIAL L.M., GIL A. Evidence of the Anti-Inflammatory Effects of Probiotics and Synbiotics in Intestinal Crohnic Diseases. **Nutrients**. v. 9, n. 6, p. 555, 2017.

PÖRTNER, R., FASCHIAN, R., GOELLING, D. Fermentation of lactic acid bacteria: state of the art and new perspectives. **Applied Biocatalysis. From Fundamental Science to Industrial Applications**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2016.

QUINTO, E. J. et al. Probiotic lactic acid bacteria: a review. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, n. 18, p. 1765, 2014.

SAADATZADEH A., ATYABI F., FAZELI M. R. et al., Biochemical and pathological evidences on the benefit of a new biodegradable nanoparticles of probiotic extract in murine colitis. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 26, no. 5, pp. 589–598, 2012.

SANTOS, Liliane. Oliveira dos. **Probióticos no tratamento e prevenção de recidivas das doenças inflamatórias intestinais: uma revisão**. Monografia (Graduação em Nutrição), Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Sergipe, Lagarto, 2017.

SARAIVA, T. D., MORAIS, K., PEREIRA, V. B., DE AZEVEDO, M., ROCHA, C. S., PROSPERI, C. C., GOMES-SANTOS, A. C., BERMUDEZ-HUMARAN, L., FARIA, A. M., BLOTTIERE, H. M., LANGELLA, P., MIYOSHI, A., DE LEBLANC, A., LEBLANC, J. G., & AZEVEDO, V. (2015). Milk fermented with a 15-lipoxygenase-1-producing

Lactococcus lactis alleviates symptoms of colitis in a murine model. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 424–429.

SIMEOLI R., MATTACE RASO G., LAMA A., et al. Preventive and therapeutic effects of *Lactobacillus paracasei* B21060-based synbiotic treatment on gut inflammation and barrier integrity in colitic mice. **Journal of Nutrition**. v. 145, n. 6, p.1202-1210. 2015.

SONG, A. A. et al. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. **Microbial cell factories**, v. 16, n. 1, p. 55, 2017.

SPAISER S.J., CULPEPPER T., NIEVES C. J.R., et al. *Lactobacillus gasseri* KS-13, *Bifidobacterium bifidum* G9-1, and *Bifidobacterium longum* MM-2 Ingestion Induces a Less Inflammatory Cytokine Profile and a Potentially Beneficial Shift in Gut Microbiota in Older Adults: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Study. **Journal of the American College of Nutrition**. v. 34, n. 6, p. 459-469, 2015.

TAN, X. D., LIU, Q. P., Hsueh, W., Chen, Y. H., Chang, H., Gonzalez-Crussi, F. Intestinal trefoil factor binds to intestinal epithelial cells and induces nitric oxide production: priming and enhancing effects of mucin. **Biochemical Journal**, v. 338, n. 3, p. 745-751, 1999.

THOMPSON-CHAGOYÁN O.C., MALDONADO J., GIL A. Colonization and impact of disease and other factors on intestinal microbiota. **Digestive Diseases and Sciences**. v. 52, n. 9, p. 2069-2077, 2007.

TORINO, M. I.; MOZZI, F.; FONT DE VALDEZ, G. Exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.68, p.259-265, 2005.

VANDENBROUCKE K., HANS W., VAN HUYSSSE J., NEIRYNCK S., DEMETTER P., REMAUT E., ROTTIERS P., STEIDLER L. Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice. **Gastroenterology**. v.127, n. 2, p. 502-513. 2004.

VILELA, E. G. et al. Inflammatory bowel disease care in brazil: how it is performed, obstacles and demands from the physicians' perspective. **Arquivos de Gastroenterologia**. v. 57, n. 4, p. 416-427, 2020.

WGO PRACTICE GUIDELINE - INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD). Disponível em: < ["https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/inflammatory-bowel-disease-ibd"](https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/inflammatory-bowel-disease-ibd)>. Acesso em 18/10/2020.

ZURITA-TURK M., MENDES S.B, PRÓSPERI C.C., BASTOS P.V, PECINI C.V., MELO P. T., CAETANO F.A.M., CARMONA C. M. D., MIYOSHI A. Attenuation of intestinal inflammation in IL-10 deficient mice by a plasmid carrying *Lactococcus lactis* strain. **BMC Biotechnology.** v. 20, n. 1, p. 1-12, 2020.

Artigo de Dissertação

Efeito probiótico de *Lactococcus lactis* na prevenção e no tratamento de doenças inflamatórias intestinais em camundongos: uma revisão sistemática

Tamires Rizzi^a; Paola Quevedo da Costa^a; Felipe Mendes Delpino^b; Thaynã Ramos Flores^c; Simone Pieniz^a

^aPrograma de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 96010-610, Pelotas-RS, Brasil.

^bPrograma de Pós-graduação em Enfermagem, Universidade Federal de Pelotas, 96010-610, Pelotas-RS, Brasil

^cPrograma de Pós-Graduação em Epidemiologia, Universidade Federal de Pelotas, 96020-220, Pelotas-RS, Brasil

***Autor correspondente:** Simone Pieniz - Rua Gomes Carneiro n. 1, Pelotas-RS, Brazil, Caixa Postal: 96010-610, Tel.: +55 53 3921 1309; Fax: +55 53 3921 1526. E-mail: nutrisimone@yahoo.com.br

Resumo

No Brasil, as doenças inflamatórias intestinais acometem, aproximadamente, 10 a 27 indivíduos a cada 100 mil habitantes. Essas patologias são causadas pela interação de fatores genéticos, microbiota e imunorregulação da mucosa intestinal. O efeito benéfico das bactérias ácido lácticas como probióticos no ambiente intestinal vem sendo estudado por muitos pesquisadores, pois os metabólitos ativos liberados por essas bactérias no trânsito intestinal podem permear a camada intestinal para exercer efeitos anti-inflamatórios, estabilizar a camada de muco e auxiliar a cicatrização do epitélio intestinal. Estudos experimentais e observacionais em animais demonstram que *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) é capaz de criar e manter um ambiente anti-inflamatório no trato gastrointestinal e, assim, diminuir efetivamente o início da inflamação em doenças como a Retocolite Ulcerativa e a Doença de Crohn. Assim, o objetivo do presente estudo foi realizar uma revisão sistemática da literatura para avaliar o efeito probiótico da bactéria ácido láctica *L. lactis* na prevenção e no tratamento de DII, mais especificamente, na Doença de Crohn e na Retocolite Ulcerativa, em camundongos. As bases de dados utilizadas foram *Cochrane Library* e

PubMed e os descritores utilizados foram *L. lactis*, Inflammatory bowel disease, Prevention, Treatment, Crohn's disease, Ulcerative Retocolitis e Acid Lactic Bacteria. Foram encontrados 3.320 artigos ao total, sendo que apenas seis foram incluídos na revisão, sendo que todos eram estudos experimentais com animais, devido à ausência significativa de estudos com humanos. De acordo com os resultados encontrados, é possível sugerir que esta espécie de bactéria ácido láctica pode auxiliar no tratamento e na modulação intestinal de animais que apresentam Retocolite Ulcerativa e Doença de Crohn. O presente estudo sugere ainda uma possível alternativa ao tratamento e modulação das doenças inflamatórias intestinais em seres humanos, de tal forma que a bactéria em estudo, *L. lactis*, é capaz de auxiliar na remissão de sintomas e, conseqüentemente, fornecer maior qualidade de vida aos pacientes acometidos por estas doenças.

Palavras-chave: Doença de Crohn; Retocolite Ulcerativa; Inflamação; Microbiota; Bactéria ácido láctica, *Lactococcus*.

Abstract

In Brazil, inflammatory bowel diseases affect approximately 10 to 27 individuals per 100 thousand inhabitants. These pathologies are caused by the interaction of genetic factors, microbiota, and intestinal mucosal immunoregulation. The beneficial effect of lactic acid bacteria as probiotics on the intestinal environment has been studied by many researchers since the active metabolites released by these probiotic bacteria in intestinal transit can permeate the intestinal layer to exert anti-inflammatory effects, stabilize the mucus layer and help the intestinal epithelium to heal. Experimental and observational studies demonstrate that *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) bacteria can create and maintain an anti-inflammatory environment in the gastrointestinal tract and, thus, effectively reduce the onset of inflammation in diseases such as ulcerative colitis and Crohn's disease. So, the objective of the present study is to evaluate the probiotic effect of the lactic acid bacteria *L. lactis* in the prevention and treatment of inflammatory bowel diseases in mice through a systematic review of the literature. The databases used were Cochrane Library and PubMed and the descriptors used were *L. lactis*, Inflammatory bowel disease, Prevention, Treatment, Crohn's disease, Ulcerative Retocolitis, and Acid Lactic Bacteria. In total, 3.320 articles were found, of which only

six were included in the review. According to the results, it is possible to suggest that this species of lactic acid bacteria can help in the treatment and intestinal modulation of animals that have Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. The present study suggests a possible alternative to the treatment and modulation of inflammatory bowel diseases in humans, in such a way that the bacterium under study, *L. lactis*, can be able to assist in the remission of symptoms and, consequently, provide a better quality of life for patients affected by these diseases.

Keywords: Crohn's disease; Ulcerative colitis; Inflammation; Microbiota; Lactic acid bacteria; *Lactococcus*.

1. Introdução

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças inflamatórias crônicas recorrentes que incluem principalmente a Doença de Crohn e a Retocolite Ulcerativa, as quais apresentam características clínicas e patológicas sobrepostas e distintas (Halpin; Ford, 2012). As DII acometem principalmente jovens em fase produtiva, o pico de início da doença ocorre entre 15 e 30 anos de idade, com um segundo pico menos significativo entre os 50 e 70 anos. São mais prevalentes em indivíduos de raça caucasiana, que vivem em áreas urbanas e industrializadas e a distribuição entre os sexos é uniforme (Vilela et al., 2020). Essas doenças são causadas pela interação entre fatores genéticos, microbiota e imunorregulação da mucosa intestinal. A Retocolite Ulcerativa compromete o reto e o cólon, enquanto a Doença de Crohn pode comprometer qualquer parte do trato digestivo, da boca ao ânus, mas a região ileal e ileocecal são seus principais alvos.

O uso de probióticos vem apresentando características promissoras na prevenção e no tratamento, contribuindo para o bom prognóstico dessas doenças (Bai et al., 2006; Amer et al., 2018). Os probióticos podem auxiliar na saúde intestinal por meio da função de melhora na barreira epitelial intestinal, por modificação do pH, por efeitos imunomoduladores, por degradação de receptores de toxinas, assim como competição por nutrientes, produção de substâncias inibitórias de patógenos, bloqueio de sítios de adesão desses patógenos e modulação da microbiota intestinal (Bermudez-Brito et al., 2012; Bajaj, Amaral e Shibl, 2015; Claes e Lebeer, 2019).

Nesse sentido, o efeito benéfico das bactérias ácido lácticas (BAL), como probióticos no ambiente intestinal vem sendo estudado, especialmente no que diz respeito à diminuição da inflamação intestinal por neutralização de citocinas pró inflamatórias, redução de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), modulação da resposta imune, redução dos escores de atividade de doenças inflamatórias e diminuição de características patológicas do intestino grosso e delgado (Kim e Liu, 2002; Hanson et al., 2013; Gomes-Santos et al., 2017; Kosler et al., 2017).

Devido ao aumento do tônus supressor do microambiente intestinal em condições basais, os metabólitos ativos liberados pelas bactérias probióticas durante o trânsito intestinal, podem permear a camada intestinal para exercer efeitos anti-inflamatórios, estabilizar a camada de muco, auxiliar na cicatrização

do epitélio e produzir ácidos graxos de cadeia curta, que atuam como protetores da mucosa (Ménard et al., 2004; Vandenbroucke et al., 2004; Saadatzadeh et al., 2012).

Especificamente *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) é capaz de criar e manter um ambiente anti-inflamatório no trato gastrointestinal e, assim, diminuir efetivamente o início da inflamação em diversos modelos de camundongos, por meio da inibição da produção de Interferon-gama (IFN- γ), Interleucina (IL) 6 (IL-6) e TNF- α e aumento da produção de IL-10 no tecido colônico (Zurita-Tukr et al., 2020; Gomes-Santos et al., 2017). O uso de BAL no tratamento dos sintomas na Doença de Crohn e na Retocolite Ulcerativa parece ser promissor (Bai et al., 2006; Ballal et al., 2015; Spaiser et al., 2015), entretanto, ainda não são encontrados na literatura estudos de revisão sistemática que demonstrem a associação do efeito benéfico de *L. lactis* no tratamento, na prevenção e na remissão das DII. Além disso, há necessidade da realização de um estudo mais aprofundado, por meio de metodologias, critérios específicos e análise quantitativa dos resultados, acerca deste tema.

Assim, este estudo teve por objetivo realizar uma revisão sistemática da literatura para analisar o efeito probiótico da BAL *L. lactis* na prevenção e no tratamento de DII, mais especificamente, na Doença de Crohn e na Retocolite Ulcerativa, em camundongos.

2. Métodos

2.1 Fontes de dados e estratégia de pesquisa

O presente estudo foi conduzido por meio de uma revisão sistemática da literatura de acordo com a recomendação PRISMA (Page et al., 2021) que consiste na aplicação de um *checklist* e construção de um fluxograma, o qual demonstra os resultados obtidos no levantamento.

A presente revisão sistemática disserta sobre o efeito probiótico de *L. lactis* na prevenção e no tratamento de DII. Foi realizada a busca nas seguintes bases de dados: PubMed, LILACS, Scopus, Web of Science, Cochrane até dezembro de 2020.

Foram utilizados os seguintes descritores: *Lactococcus lactis* AND ulcerative colitis, Inflammatory bowel disease AND Lactic acid bacteria,⁴⁰

Inflammatory bowel disease AND *Lactococcus lactis*, Probiotic AND Crohn's disease OR ulcerative colitis, *Lactococcus lactis* AND ulcerative colitis OR Crohn's disease, Inflammatory bowel disease AND prevention AND *Lactococcus lactis*, Inflammatory bowel disease AND treatment AND *Lactococcus lactis*, Inflammatory bowel disease AND treatment AND acid lactic bacteria, Inflammatory bowel disease AND treatment AND acid lactic bacteria, Inflammatory bowel disease AND prevention AND acid lactic bacteria, Crohn's disease AND prevention AND *Lactococcus lactis* e Ulcerative retocolitis AND prevention AND *Lactococcus lactis*.

As buscas nas bases de dados incluíram estudos que avaliaram o efeito probiótico de *L. Lactis* nas DII e manuscritos com os descritores no título e/ou resumo.

2.2 Critérios de inclusão e exclusão

Esta revisão incluiu estudos originais com delineamento experimental, os quais avaliaram o efeito do uso de probiótico oriundo da BAL *L. lactis* na remissão e no tratamento de DII. Foram excluídos estudos observacionais, qualitativos, com populações humanas, estudos em andamento, bem como aqueles que não contemplavam a bactéria ácido láctica *L. lactis* ou as DII objeto deste estudo.

2.3 Seleção de estudos

Após todos os artigos possíveis estarem inclusos em um único arquivo, verificou-se manualmente os registros duplicados e os mesmos foram excluídos utilizando o software Endnote x7.

Dois revisores independentes (TR e PQC) avaliaram os títulos, resumos e textos completos. As discordâncias foram resolvidas por consenso e todas as referências dos estudos incluídos foram revisadas para possíveis artigos adicionais. Todo o processo de seleção foi realizado por meio da plataforma Endnote.

2.4 Avaliação do risco de viés em estudos incluídos

Para avaliar o risco de viés, aplicou-se a ferramenta Cochrane. Dois revisores independentes avaliaram os riscos de viés e as discordâncias foram

resolvidas por consenso. Esta escala inclui informações sobre a geração de sequência (viés de seleção), ocultação de alocação (viés de seleção), ocultação de participantes (viés de desempenho), ocultação de avaliação de resultados (viés de detecção), dados de resultados incompletos (viés de atrito), relatórios seletivos (viés de notificação), outro viés (outro viés potencial, não incluído nos domínios descritos acima). Os componentes metodológicos dos estudos foram avaliados e classificados como risco de viés baixo, alto ou incerto.

3. Resultados

A pesquisa bibliográfica com os descritores que incluíam *L. lactis* e a Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa realizada nas bases de dados PubMed e Cochrane Library resultou em um quantitativo de 3.320 artigos científicos. Os principais critérios de exclusão suprimiram os artigos relativos a outras BAL que não fossem *L. lactis*, bem como excluíram os artigos que contemplassem outras doenças que não fossem as DII abordadas neste estudo. Também foi utilizado como critério de exclusão os artigos que não fossem em roedores (*in vivo*). Estes artigos foram revisados por dois indivíduos, e, em caso de discordância entre o par, uma terceira pessoa foi responsável pela decisão final.

O fluxograma apresentado abaixo (Figura 1), é um exemplo hipotético contendo todos os passos seguidos para a seleção dos artigos incluídos na revisão sistemática.

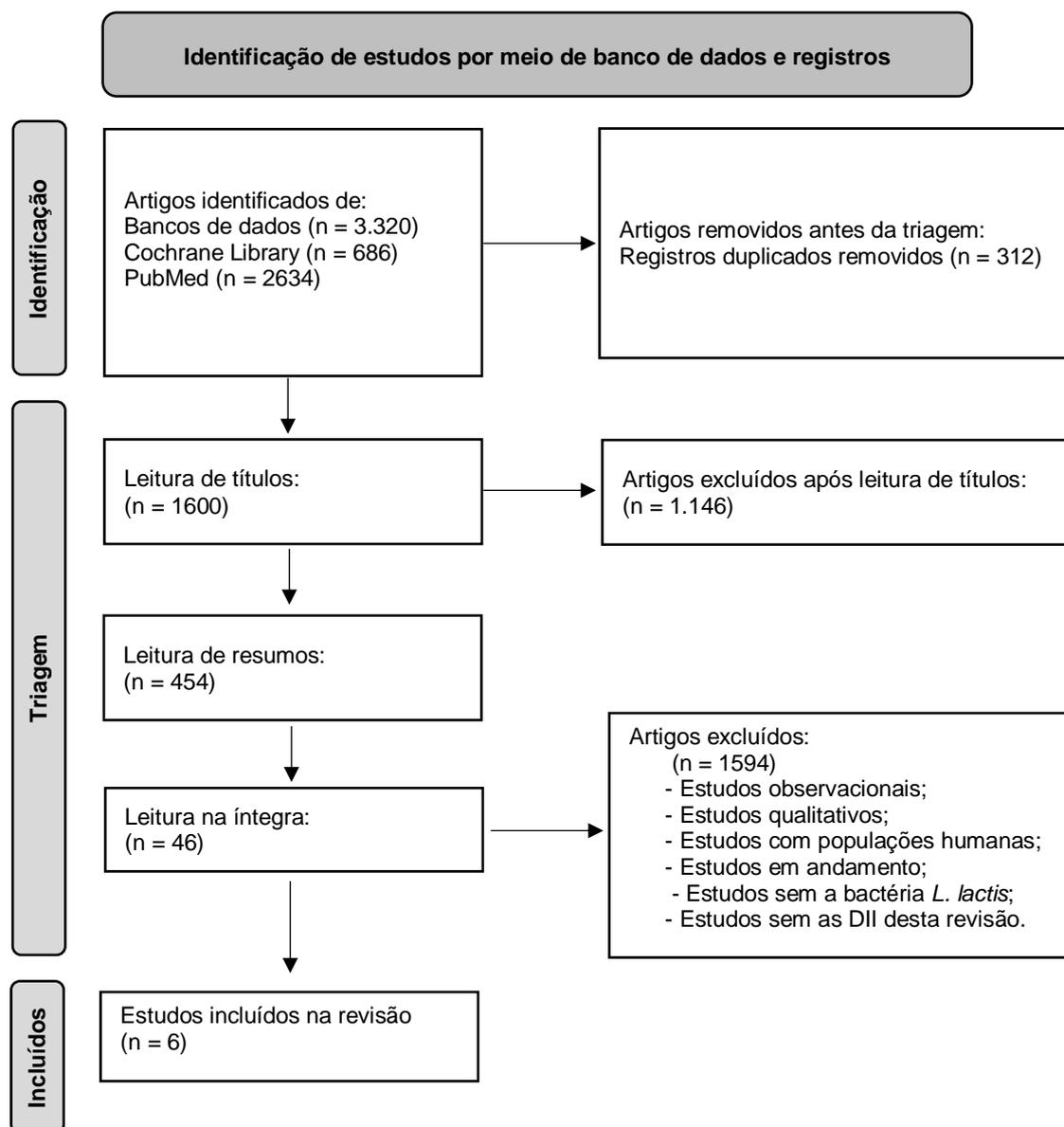


Figura 1. Fluxograma gráfico da metodologia utilizada na seleção dos artigos a incluídos na revisão sistemática.

Após a leitura de títulos, foram selecionados cerca de 1.600 artigos de relevância científica para o tema estudado, sendo que, destes, apenas 454 artigos foram selecionados para a leitura de resumos. A pesquisa seguiu, portanto, para a leitura dos artigos da íntegra, em um total de 46 artigos. Ao final, foram encontrados seis (n=6) artigos (Tabela 1) que demonstraram o efeito probiótico de *L. lactis* na prevenção e na modulação de DII.

Tabela 1. Descrição detalhada de cada estudo incluído na revisão sistemática. (n=6)

Número do artigo	Último nome do primeiro autor e ano	País/localidade	Modelo experimental (critérios de inclusão)	Tratamento	Tempo de exposição	Medida de efeito	Tipo da medida	Resultados
1	Chiabai, 2019	Brasil	Camundongos fêmeas	<i>L. lactis</i> MG1363 FnBPA+ (pValac: anti-TNF α)	04 dias após indução de colite por DSS	ANOVA BONFERRONI E MANN-WHITNEY TEST	Absoluta	Melhora da retocolite induzida experimentalmente
2	Song, 2019	China	Camundongos fêmeas	Lactoferricina-lactoferrampina bovina que codifica <i>L. lactis</i>	07 dias com indução de colite	ANOVA e TUKEY'S TEST	Absoluta	Melhora a lesão intestinal induzida por DSS em camundongos
3	Foligne, 2007	França	Camundongos fêmeas	Administração oral de baixa resposta de cálcio V (Lcrv) secretando <i>L. lactis</i>	04 dias após indução da colite	MANN-WHITNEY'S TEST	Relativa	Diminuição da inflamação intestinal induzida experimentalmente em dois modelos murinos de retocolite
4	Saha, 2017	EUA	Camundongos C57BL/6 de tipo selvagem	<i>L. lactis</i> expressando Lipocalin-2	04 dias após indução de colite	DUNNETT'S POST HOC TEST e TUKEY'S TEST	Relativa	Mucoproteção contra inflamação intestinal

5	Wong, 2017	China	Camundongos machos	Administração oral em camundongo codificando catelicidina <i>L. lactis</i>	04 dias pós indução de colite por DSS	ANOVA e DUNNETT'S	Absoluta	Melhora dos sintomas clínicos mantem a integridade da cripta intestinal e preserva a camada de secreção de muco em animais com retocolite
6	Cunha, 2020	Brasil	Camundongos fêmeas	Linhagem invasiva e produtora de Hsp65 [<i>L. lactis</i> NCDO2118 FnBPA+ (pXYCYT:Hsp65)]	04 dias após indução da colite por TNBS	ANOVA e TUKEY'S TEST	Absoluta	Redução da gravidade do dano inflamatório

Com o intuito de avaliar o risco de viés deste estudo foi utilizada a ferramenta RoB 2.0 (*Revised Cochrane risk-of-bias tool for randomized trials*) recomendada pela colaboração Cochrane (Tabela 2). Todos estudos apresentaram baixo risco de viés no processo de randomização, desvios de intervenções pretendidas e seleção do resultado relatado. No entanto, algumas preocupações foram observadas em dados de desfecho ausente e medição do resultado. Dessa maneira, todos estudos apresentaram algumas preocupações no viés geral.

Tabela 2. Risco de viés dos ensaios clínicos randomizados incluídos e avaliados por meio de RoB 2.0.

RoB 2.0							
Estudo	Processo de randomização	Risco de viés decorrente de efeitos de período e transferência	Desvios de intervenções pretendidas	Dados de desfecho ausentes	Medição do resultado	Seleção do resultado relatado	Viés Geral
Chiabai et al., 2019	Baixo risco	NA	Baixo risco	Algumas preocupações	Algumas preocupações	Baixo risco	Algumas preocupações
Song et al., 2019	Baixo risco	NA	Baixo risco	Algumas preocupações	Algumas preocupações	Baixo risco	Algumas preocupações
Foligne et al., 2007	Baixo risco	NA	Baixo risco	Algumas preocupações	Algumas preocupações	Baixo risco	Algumas preocupações
Saha et al., 2017	Baixo risco	NA	Baixo risco	Algumas preocupações	Algumas preocupações	Baixo risco	Algumas preocupações
Wong et al., 2017	Baixo risco	NA	Baixo risco	Algumas preocupações	Algumas preocupações	Baixo risco	Algumas preocupações
Cunha et al., 2020	Baixo risco	NA	Baixo risco	Algumas preocupações	Algumas preocupações	Baixo risco	Algumas preocupações

Os resultados da revisão de Chiabai et al. (2019) demonstram que a utilização de *L. lactis* como vetor de entrega de anti-fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) apresentou melhora na retocolite induzida experimentalmente em camundongos fêmeas. Várias citocinas são conhecidas por estarem envolvidas em DII (Park et al., 2017), portanto suas concentrações séricas foram avaliadas. Chiabai et al. (2019) demonstram que a secreção excessiva de citocinas pró-inflamatórias está relacionada à inflamação intestinal.

Também foi possível verificar em outro estudo conduzido por Song et al. (2019) na China, que camundongos fêmeas apresentaram melhora na lesão intestinal de Retocolite Ulcerativa induzida com dextran sulfato de sódio (DSS) e posterior entrega de uma lactoferricina-lactoferrampina bovina que codifica *L. lactis*. Isto se deve ao fato de que algumas dessas bactérias ácido lácticas podem conter propriedades anti-inflamatórias significativas reforçando consideravelmente a eficácia terapêutica de tal abordagem (Foligne et al., 2005).

Em outro estudo conduzido na China por Wong et al. (2017) com camundongos machos, a administração oral de catelicidina por meio do vetor *L. lactis* foi capaz de melhorar os sintomas clínicos, manter a integridade das vilosidades presentes na mucosa intestinal e preservar a camada de secreção de muco destes animais, induzidos a Retocolite Ulcerativa.

No mesmo ano, Saha (2017) encontrou mucoproteção a partir de *L. lactis* expressando Lipocalin-2 em camundongos induzidos a Retocolite Ulcerativa com DSS, além de avaliar e de constatar que a melhora de marcadores sistêmicos e colônicos se correlacionam com a gravidade da inflamação.

Wong et al. (2017) relatam que pacientes com Retocolite Ulcerativa são mais suscetíveis a exposição a toxinas do lúmen intestinal e a micro-organismos devido à perda da camada de muco. O aumento da apoptose na Retocolite Ulcerativa pode levar à quebra da função da barreira epitelial e, assim, facilitar ainda mais a invasão de substâncias intraluminais na mucosa. Os autores demonstram em seu estudo que a codificação do peptídeo antimicrobiano relacionado a catelicidina (mCRAMP) modificado *L. lactis* poderia promover efetivamente a proliferação celular na camada de muco e reduzir a morte da célula, promovendo remodelação do epitélio intestinal. O aprimoramento do reparo da mucosa permite uma recuperação mais rápida da função do tecido, levando à redução da exposição a vários agentes patogênicos que contribuem para a retocolite.

A Figura 2 demonstra a utilização de *L. lactis* como vetor de entrega de substâncias que auxiliam na modulação intestinal de camundongos nas DII (a exemplo da retocolite induzida por DSS). Além de promover a reestruturação da diversidade da microbiota por meio da inclusão de uma BAL com potencial probiótico, *L. lactis* como vetor de entrega auxilia na manutenção da integridade

da camada de muco, tornando-a mais funcional. Dessa forma, a camada de muco garante a proteção do órgão e age como barreira física contra patógenos.

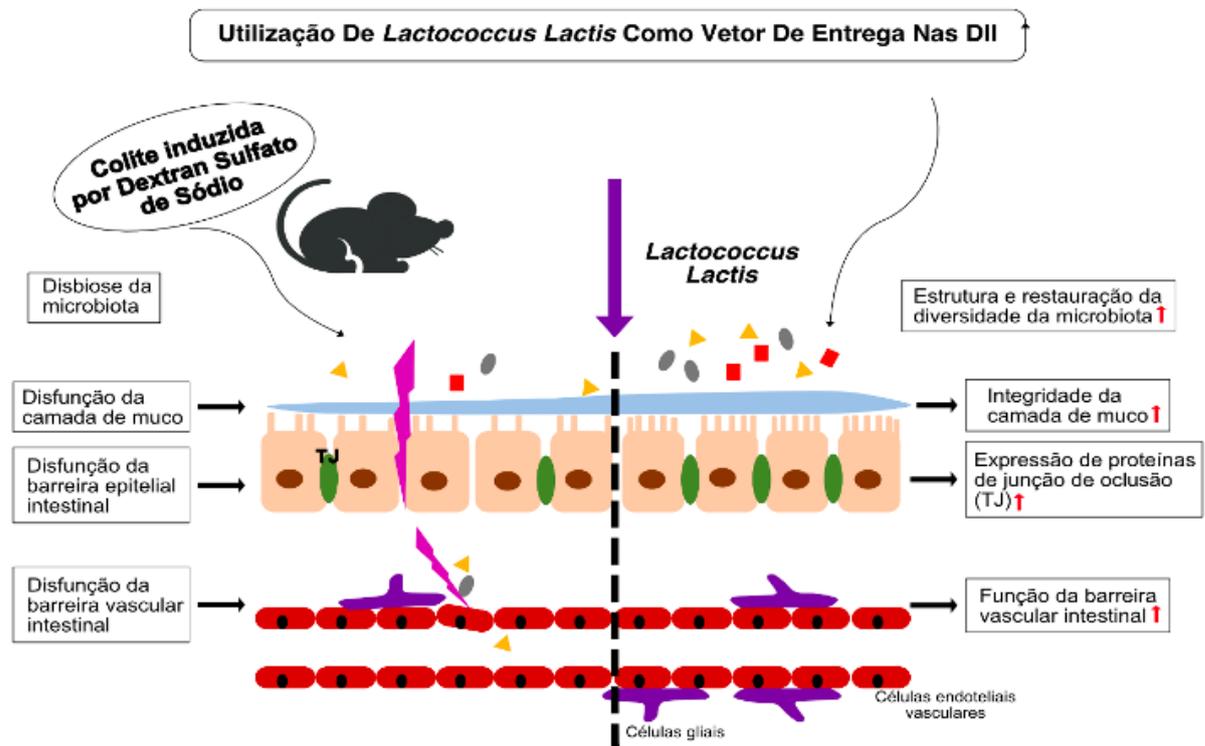


Figura 2. Utilização de *Lactococcus lactis* como vetor de entrega nas doenças inflamatórias intestinais.

Fonte: Elaborada pelos próprios autores.

Outro aspecto importante demonstrado na Figura 2 é que *L. lactis* é capaz de devolver a funcionalidade da barreira epitelial intestinal por meio do aumento da expressão das proteínas de junção de oclusão (*tight junctions*), que permitem que a permeabilidade seletiva do intestino seja mantida. Já a barreira vascular intestinal, que fica comprometida com o aparecimento das DII, é beneficiada com *L. lactis*, pois esta é capaz de manter a integridade da camada transepitelial que reveste o intestino e é responsável pela permeabilidade vascular intestinal.

De acordo com os resultados, a utilização de *L. lactis* como vetor de entrega auxilia na remissão das DII. No estudo de Chiabai et al. (2019), os camundongos tratados apenas com DSS, sem administração de bactérias apresentaram uma pontuação histológica de $2,1 \pm 0,13$ e os camundongos tratados com a linhagem invasiva *L. lactis* mais plasmídeo (LLF) apresentaram uma pontuação de $2,0 \pm 0,22$. Além disso, os camundongos que receberam *L.*⁴⁸

lactis com anticorpo antiTNF α apresentaram um índice de atividade da doença significativamente menor ($1,1 \pm 0,15$) e, portanto, um processo inflamatório reduzido em comparação aos camundongos do grupo LL-F.

Também foi possível notar que, no estudo de Song et al. (2019), os escores de atividade da doença para os grupos sem a bactéria *L. lactis* foram significativamente maiores do que os do grupo onde *L. lactis* era o vetor. O escore histológico reduziu de 7 para 5. Após o tratamento com *L. lactis* codificando lactoferricina-lactoferrampina bovina a maioria dos índices característicos recuperaram ou foram semelhantes ao grupo controle.

No estudo de Foligne et al. (2007) a suplementação oral de camundongos com *L. lactis* produzindo IL-10 ou proteína V de baixa resposta ao cálcio conferiu grau semelhante de proteção contra colite induzida por ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS), com reduções equivalentes na perda de peso corporal, escores de atividade macroscópica da doença e melhorias histológicas semelhantes e, reduções na atividade da mieloperoxidase tecidual. No mesmo estudo, após a indução da colite por DSS, a mucosa e a submucosa do cólon de camundongos tratados com *L. Lactis* associado com proteína V de baixa resposta ao cálcio foram quase normais, apenas com uma leve infiltração de algumas células inflamatórias.

Assim como nos estudos anteriores, a análise histológica realizada por Saha et al. (2017) indicou que a colite em camundongos tratados com DSS + *L. lactis* +Lipocalin 2 apresentou menor gravidade, quando comparado somente com a administração de DSS e camundongos tratados com DSS + *L. lactis*, observando uma diminuição no escore histológico de 8 para 7. O mesmo foi observado no estudo de Wong et al. (2017), onde o escore passou de 2 para 1, sendo que essa redução foi comparada com o uso do medicamento sulfazalazina, comumente utilizado no tratamento de DII.

Cunha em 2020, analisou amostras histológicas de camundongos após indução de colite e evidenciou que o grupo contendo a bactéria *L. lactis* apresentou lesões caracterizadas como leves. Dessa forma, a fibrose tecidual intestinal dos camundongos tratados passou do escore 15 para o escore 10, sendo que essa medida foi associada com a intensidade do infiltrado inflamatório agudo, hiperemia, erosão e necrose.

É possível sugerir, levando-se em consideração o possível benefício da utilização de *L. lactis* nas DII aqui apresentados, que esta espécie de BAL pode auxiliar no tratamento e na modulação intestinal de animais que apresentam Retocolite Ulcerativa e Doença de Crohn. Sendo assim, o presente estudo sugere uma possível alternativa ao tratamento e modulação das DII em seres humanos, de tal forma que a bactéria em estudo é capaz de auxiliar na remissão de sintomas e, conseqüentemente, fornecer maior qualidade de vida aos pacientes acometidos por estas doenças.

4. Discussão

Muitas bactérias probióticas têm sido descritas como ferramentas promissoras para o tratamento e prevenção de DII, como a BAL *L. lactis*. Na presente revisão sistemática, encontramos que *L. lactis* é uma bactéria probiótica com ação potencial no tratamento de DII e elucidamos alguns dos mecanismos subjacentes ao seu efeito anti-inflamatório, a exemplo da Figura 2 demonstrada anteriormente. Desta forma, foram encontrados seis artigos que demonstraram o efeito probiótico de *L. lactis* na prevenção e na modulação de DII.

Como demonstra Shigemori e Shimosato (2017) a entrega direcionada ao local de moléculas com propriedades anti-inflamatórias usando probióticos geneticamente modificados, mostra-se promissora como uma nova estratégia para a prevenção e tratamento da DII. Segundo os autores, as vantagens dos probióticos incluem a capacidade de usar bactérias como veículo de entrega, permitindo o uso seguro e de longo prazo por seres humanos, diminuição dos riscos de efeitos colaterais e redução de custos.

A redução do índice de atividade da doença pode ser observada quando há uma diminuição do escore histológico no ambiente intestinal de animais acometidos pelas DII. Saha et al. em 2017, observaram que houve uma diminuição no escore histológico, evidenciando a redução do escore 8 para o escore 7. Os resultados apresentados por este estudo corroboram com o estudo de Steidler et al. (2003), que administraram *L. lactis* modificado secretando IL-10 em dois modelos de camundongos após indução de colite ulcerativa induzida com DSS. No estudo, *L. lactis* modificado como vetor de entrega de IL-10,

apresentou significativa redução da colite (cerca de 50%), além de prevenir o aparecimento da colite ulcerativa nestes animais.

Já no estudo de Simcic et al. (2019), cepas de *L. lactis* foram utilizadas para induzir um perfil de citocinas anti-inflamatórias *ex vivo* na mucosa inflamada por DII. Quando a mucosa acometida por DII foi incubada com qualquer cepa de *L. lactis* a 1×10^9 UFC/mL, os níveis de TNF- α e IL-23 foram significativamente diminuídos em relação aos da cultura estéril. No estudo de Foligne et al. (2007) a mucosa e a submucosa do cólon de camundongos tratados com a utilização de *L. lactis* como vetor de entrega também apresentaram apenas uma leve infiltração de algumas células inflamatórias, apresentando características semelhantes à de uma mucosa intestinal saudável.

No estudo de Wang et al. (2019), a administração oral de *L. lactis* como vetor de entrega de citocinas anti-inflamatórias induziu o acúmulo de IL-35 no lúmen intestinal de camundongos. Quando administrado preventivamente, os camundongos exibiram diminuição da perda de peso, redução do encurtamento do cólon, bem como alterações histopatológicas associadas a colite, indicando que a administração oral de *L. lactis* como vetor de entrega de IL-35 contribuiu para a supressão de DSS induzida, impedindo a progressão da colite. A progressão da colite também foi impedida com a redução de alterações histopatológicas no estudo de Cunha (2020), onde a fibrose tecidual intestinal dos camundongos tratados passou do escore 15 para o escore 10.

No estudo de Zurita-Turk et al. (2020), a administração oral de *L. lactis* para camundongos com deficiência de IL-10 não apenas levou à produção de IL-10 por estes, como também, conseqüentemente, diminuiu o agravamento da doença, apresentando menor escores e danos histológicos, aumento dos níveis de IL-10 e tendência a diminuir os níveis de citocinas pró-inflamatórias. Já Berlec et al. (2017), administrou *L. lactis* e aliviou a gravidade da colite uma semana após a indução da colite com DSS, mais eficazmente quando administrado de forma preventiva antes, durante e após a administração de DSS.

Em Souza et al. (2016) a IL-4 foi inserida em *L. lactis* para avaliar o potencial terapêutico da cepa recombinante contra colite induzida por TNBS em ratos. A administração intragástrica de *L. lactis* foi capaz de diminuir a gravidade da colite, com camundongos apresentando níveis diminuídos de atividade de IL-12, IL-6 e da enzima mieloperoxidase; e níveis aumentados de IL-4 e IL-10. Este

estudo mostra que *L. lactis* é uma boa escolha para manter o equilíbrio anti-inflamatório e pró-inflamatório no trato gastrointestinal, aumentando os níveis de secreção de IL-10 células reguladoras e, assim, demonstrando a eficácia desta nova estratégia baseada na entrega de DNA. Dados semelhantes a este estudo foram observados no estudo de Foligne et. al (2007), no qual observou-se uma redução nos escores de atividade macroscópica da doença e redução na atividade da mieloperoxidase tecidual.

Shigemori et al. (2015) desenvolveu uma cepa de *L. lactis* que secreta a molécula anti-inflamatória recombinante heme oxigenase-1 de camundongos. Os efeitos da dosagem oral contínua de curto prazo foram avaliados em camundongos com colite aguda induzida por DSS como um modelo de DII. A colite aguda em camundongos foi acompanhada por um aumento na pontuação do índice de atividade da doença e alterações histopatológicas. O mesmo pôde ser observado no estudo de Song (2019), onde os camundongos que receberam substância contendo *L. lactis* como vetor de entrega, apresentaram um índice de atividade da doença significativamente menor e, portanto, um processo inflamatório reduzido em comparação aos camundongos do grupo sem a utilização de *L. lactis* como vetor.

A administração oral diária de *L. lactis* secretando heme oxigenase-1 melhorou significativamente os sintomas associados à colite. Além disso, aumentou significativamente a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 e diminuiu a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 α e IL-6 no cólon em comparação com uma cepa de controle vetorial.

O tratamento sistêmico de pacientes com DII com anticorpos anti-fator de TNF- α é uma abordagem altamente promissora, mas várias desvantagens permanecem, incluindo efeitos colaterais relacionados à administração sistêmica e alto custo do tratamento. No estudo de Vandembroucke (2010), *L. lactis* foi projetado para secretar nanocorpos monovalentes e bivalentes murinos neutralizantes de TNF- α como proteínas terapêuticas, que são mais estáveis que os anticorpos convencionais. Os nanocorpos secretados por *L. lactis* neutralizaram o TNF- α *in vitro*. A administração oral diária de *L. lactis* secretora de nanocorpos resultou na entrega local de nanocorpos anti- TNF- α no cólon e reduziu significativamente a inflamação em camundongos com colite crônica

induzida por DSS. Além disso, essa abordagem também foi bem sucedida em melhorar a enterocolite estabelecida em camundongos com deficiência de IL-10.

Segundo Plavec e Berlec (2019), BAL como *Lactococcus* e *Lactobacillus*, têm um longo histórico de uso na indústria de alimentos e estão se tornando atraentes para uso terapêutico devido à sua segurança, efeitos benéficos intrínsecos à saúde e considerável potencial biotecnológico. Os sistemas estabelecidos para engenharia são combinados com novas abordagens para permitir o uso das bactérias ácido lácticas como vetores para entrega de várias moléculas terapêuticas, pois podem ser usados para o tratamento ou prevenção de inúmeras condições: DII, infecções e doenças autoimune.

5. Conclusão

É possível sugerir, levando-se em consideração o possível benefício da utilização de *L. lactis* nas DII aqui apresentados, que esta bactéria pode auxiliar no tratamento e na modulação intestinal de animais que apresentam Retocolite Ulcerativa e Doença de Crohn. O presente estudo sugere ainda uma possível alternativa ao tratamento e modulação das DII em seres humanos, de tal forma que a bactéria em estudo, *L. lactis*, é capaz de auxiliar na remissão de sintomas e, conseqüentemente, fornecer maior qualidade de vida aos pacientes acometidos por estas doenças.

6. Referências

- AAMANN, L., VESTERGAARD, E.M., GRØNBÆK, H. Trefoil factors in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, v. 20, n. 12, p. 3223, 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Probióticos: Probióticos: construção da lista de linhagens probióticas, [s. l.], p. 1–14, 2017.
- AKBAR, A. et al. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from fermented milk products and its antimicrobial potential. **CyTA - Journal of Food**, v. 17, n. 1, p. 214-220, 2019.
- AMARAL, A. A., SHIBL A. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. **Saudi Pharmaceutical Journal**. v. 23 n. 2. p. 107-114, 2004.

AMER, M., NADEEM, M., NAZIR, SUR, FAKHAR, M., ABID, F., AIN, Q-U & ASIF, E., Probiotics and Their Use in Inflammatory Bowel Disease, **Alternative therapies in health and medicine**, v. 24, n. 3, p. 16–23, 2018.

BAI A.P., OUYANG Q., XIAO X.R., LI S.F. Probiotics modulate inflammatory cytokine secretion from inflamed mucosa in active ulcerative colitis. **International Journal of Clinical Practice**. v. 3. p. 284–288, 2006.

BAJAJ, B. K., CLAES, I. JJ, LEBEER, S. Functional mechanisms of probiotics. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, v. 2019, p. 321-327, 2019.

BALLAL S.A., VEIGA P., FENN K., et al. Host lysozyme-mediated lysis of *Lactococcus lactis* facilitates delivery of colitis-attenuating superoxide dismutase to inflamed colons. **Proceedings of the National Academic Sciences USA**. v. 112, n. 25, p.7803-7808, 2015.

BASSAGANYA-RIERA J., HONTECILLAS R., HORNE W.T., SANDRIDGE M., HERFARTH H.H., BLOOMFELD R., ISAACS K.L. Conjugated linoleic acid modulates immune responses in patients with mild to moderately active Crohn's disease. **Clinical Nutrition**. v. 31, p. 721–727, 2012.

BERMUDEZ-BRITO M., PLAZA-DÍAZ J., MUÑOZ-QUEZADA S., GÓMEZ-LLORENTE C., GIL A. Probiotic mechanisms of action. **Annals of Nutrition and Metabolism**. v. 61, n. 2, p. 160-174, 2012.

BESHKOVA, D.; FRENGOVA, G. Bacteriocins from lactic acid bacteria: microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 4, p. 419-432, 2012.

CAVANAGH, D., FITZGERALD, G. F., MCAULIFFE, O. From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. **Food Microbiology**, v. 47, p. 45–61, 2015.

CHIABAI, M. J., ALMEIDA, J. F., DE AZEVEDO, M., FERNANDES, S. S., PEREIRA, V. B., DE CASTRO, R., JERÔNIMO, M. S., SOUSA, I. G., DE SOUZA VIANNA, L. M., MIYOSHI, A., BOCCA, A. L., MARANHÃO, A. Q., & BRIGIDO, M. M. (2019). Mucosal delivery of *Lactococcus lactis* carrying an anti-TNF scFv expression vector ameliorates experimental colitis in mice. **BMC biotechnology**, v.19, n. 1, p. 38.CHUNG, Y. W. et al. *Lactobacillus casei* prevents the development of dextran sulphate sodium-induced colitis in Toll-like receptor 4

mutant mice. **Clinical and experimental immunology**. v. 151, n. 1, p. 182-189, 2008.

CUI H.-H., CHEN C.-L., WANG J.-D., et al. Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. **World Journal of Gastroenterology**. v. 10, n. 10. p.1521–1525, 2004.

DANIEL, C. et al. Dual-color bioluminescence imaging for simultaneous monitoring of the intestinal persistence of *Lactobacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* in living mice. **Applied and Environmental Microbiology**., v. 81, n. 16, p. 5344-5349, 2015.

DA CUNHA VP, Preisser TM, Santana MP, Machado DCC, Pereira VB, Miyoshi A. Mycobacterial Hsp65 antigen delivered by invasive *Lactococcus lactis* reduces intestinal inflammation and fibrosis in TNBS-induced chronic colitis model. **Science Reports**. 2020 Nov v. 18, n. 10, p. 1.

DE MORENO DE LEBLANC A., LEVIT R., DE GIORI G.S., LEBLANC J.G. Vitamin Producing Lactic Acid Bacteria as Complementary Treatments for Intestinal Inflammation. **Anti-inflammatory & Anti-allergy Agents in Medicinal Chemistry**. v. 17, n. 1. p. 50-56, 2018.

DUNHAM, Stephen P. The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine. **Research in Veterinary Science**, v. 73, n. 1, p. 9-16, 2002.

FOLIGNE B., DESSEIN R., MARCEAU M., POIRET S., CHAMAILLARD M., POT B., SIMONET M., DANIEL C. Prevention and treatment of colitis with *Lactococcus lactis* secreting the immunomodulatory *Yersinia* LcrV protein. **Gastroenterology**. v. 133, n. 3, p. 862-74, 2007. FORSYTHE, Stephen J. Microbiologia da Segurança dos Alimentos. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

GOMES-SANTOS A.C., OLIVEIRA R.P., MOREIRA T.G., CASTRO-JUNIOR A.B., HORTA B.C., LEMOS L., ALMEIDA L.A., REZENDE R.M., CARA D.C., OLIVEIRA S.C., AZEVEDO V.A., MIYOSHI A., FARIA A.M. Hsp65-Producing *Lactococcus lactis* Prevents Inflammatory Intestinal Disease in Mice by IL-10- and TLR2-Dependent Pathways. **Frontiers in Immunology**. v. 8, p. 30, 2017.

GOMES-SANTOS, ANA CRISTINA et al. New insights into the immunological changes in IL-10-deficient mice during the course of spontaneous inflammation in the gut mucosa. **Clinical & Developmental Immunology** v. 2012, 2012.

HALPIN, S.J.; FORD, A.C. Prevalence of symptoms meeting criteria for irritable bowel syndrome in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-⁵⁵

analysis. **American Journal of Gastroenterology**, v. 107, n. 10, p. 1474–1482, 2012.

HANSON M.L., HIXON J.A., LI W., et al. Oral delivery of IL-27 recombinant bacteria attenuates immune colitis in mice. **Gastroenterology**. v.146, n. 1. p. 210-221, e13, 2014.

HEGAZY S.K., EL-BEDEWY M.M. Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF-kappaB activation in ulcerative colitis. **World Journal of Gastroenterology**. v. 33, p. 4145-4151, 2010.

HOLZAPFEL, W. H. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. **International journal of food microbiology**, v. 75, n. 3, p. 197-212, 2002.

HOTER, A.; NAIM, H. Y. The Functions and Therapeutic Potential of Heat Shock Proteins in Inflammatory Bowel Disease—An Update. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 21, p. 5331, 2019.

KANAI T., MATSUOKA K., NAGANUMA M., HAYASHI A., HISAMATSU T. Diet, microbiota, and inflammatory bowel disease: lessons from Japanese foods. **The Korean Journal of Internal Medicine**.v. 29, n. 4. p. 409–415, 2014.

KIM, Y. J.; LIU, R. H. Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 5, p. 1731-1737, 2002.

KORCZ, E., KERÉNYI, Z., VARGA, L. Dietary fibers, prebiotics, and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: potential health benefits with special regard to cholesterol-lowering effects. **Food & Function**, v. 9, n. 6, p. 3057-3068, 2018.

KOSLER S., STRUKELJ B., BERLEC A. Lactic Acid Bacteria with Concomitant IL-17, IL-23 and TNF α - Binding Ability for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. v.18, n. 4, p. 318-326, 2017.

KUHL, G. C., DE DEA LINDNER, J. Biohydrogenation of Linoleic Acid by Lactic Acid Bacteria for the Production of Functional Cultured Dairy Products: A Review. **Foods (Basel, Switzerland)**. v. 5, n. 1, p. 13, 2016.

LIVERANI E., SCAIOLI E., DIGBY R.J., BELLANOVA M., BELLUZZI A. How to predict clinical relapse in inflammatory bowel disease patients. **World Journal of Gastroenterology**. v. 22, n. 3, p. 1017-1033, 2016.

MÉNARD S., CANDALH C., BAMBOU J.C., TERPEND K., CERF-BENSUSSAN N., HEYMAN M. Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. **Gut**. v. 53, n. 6, p. 821-828, 2004.

NISHITANI Y., TANOUE T., YAMADA K., et al. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. **International Immunopharmacology**. v. 9, n 12, p. 1444-1451, 2009.

PAGE M.J., MCKENZIE J.E., BOSSUYT P.M. et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. **Systematic Reviews**, v. 10, n. 89, 2021. <https://doi.org/10.1186/s13643-021-01626-4>

PLAZA-DÍAZ J., RUIZ-OJEDA F.J., VILCHEZ-PADIAL L.M., GIL A. Evidence of the Anti-Inflammatory Effects of Probiotics and Synbiotics in Intestinal Crohnic Diseases. **Nutrients**. v. 9, n. 6, p. 555, 2017.

PÖRTNER, R., FASCHIAN, R., GOELLING, D. Fermentation of lactic acid bacteria: state of the art and new perspectives. **Applied Biocatalysis. From Fundamental Science to Industrial Applications**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2016.

QUINTO, E. J. et al. Probiotic lactic acid bacteria: a review. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, n. 18, p. 1765, 2014.

SAADATZADEH A., ATYABI F., FAZELI M. R. et al., Biochemical and pathological evidences on the benefit of a new biodegradable nanoparticles of probiotic extract in murine colitis. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 26, no. 5, pp. 589–598, 2012.

SAHA P., CHASSAING B., Yeoh B.S., et al. Ectopic Expression of Innate Immune Protein, Lipocalin-2, in *Lactococcus lactis* Protects Against Gut and Environmental Stressors. **Inflammatory Bowel Disease**, v.23, n.7, p.1120-1132. 2017

SANTOS, Liliane. Oliveira dos. **Probióticos no tratamento e prevenção de recidivas das doenças inflamatórias intestinais: uma revisão**. Monografia (Graduação em Nutrição), Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Sergipe, Lagarto, 2017.

SIMEOLI R., MATTACE RASO G., LAMA A., et al. Preventive and therapeutic effects of *Lactobacillus paracasei* B21060-based symbiotic treatment on gut

inflammation and barrier integrity in colitic mice. **Journal of Nutrition**, v. 145, n. 6, p.1202-1210. 2015.

SONG, A. A. et al. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. **Microbial cell factories**, v. 16, n. 1, p. 55, 2017.

SONG L, Xie W, Liu Z, Guo D, Zhao D, Qiao X, Wang L, Zhou H, Cui W, Jiang Y, Li Y, Xu Y, Tang L. Oral delivery of a *Lactococcus lactis* strain secreting bovine lactoferricin-lactoferrampin alleviates the development of acute colitis in mice. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v.103, n.15, 2019.

SPAISER S.J., CULPEPPER T., NIEVES C. J.R., et al. *Lactobacillus gasseri* KS-13, *Bifidobacterium bifidum* G9-1, and *Bifidobacterium longum* MM-2 Ingestion Induces a Less Inflammatory Cytokine Profile and a Potentially Beneficial Shift in Gut Microbiota in Older Adults: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Study. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 34, n. 6, p. 459-469, 2015.

TAN, X. D., LIU, Q. P., HSUEH, W., CHEN, Y. H., CHANG, H., GONZALEZ-CRUSSI, F. Intestinal trefoil factor binds to intestinal epithelial cells and induces nitric oxide production: priming and enhancing effects of mucin. **Biochemical Journal**, v. 338, n. 3, p. 745-751, 1999.

THOMPSON-CHAGOYÁN, O.C., MALDONADO, J., GIL A. Colonization and impact of disease and other factors on intestinal microbiota. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, n. 9, p. 2069-2077, 2007.

TORINO, M.I., MOZZI, F., FONT DE VALDEZ, G. Exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.68, p.259-265, 2005.

VANDENBROUCKE K., HANS W., VAN HUYSSSE J., NEIRYNCK S., DEMETTER P., REMAUT E., ROTTIERS P., STEIDLER L. Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice. **Gastroenterology**, v.127, n. 2, p. 502-513. 2004.

VILELA, E. G. et al. Inflammatory bowel disease care in brazil: how it is performed, obstacles and demands from the physicians' perspective. **Arquivos de Gastroenterologia**. v. 57, n. 4, p. 416-427, 2020.

WGO PRACTICE GUIDELINE - INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD).

<https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global->

[guidelines/inflammatory-bowel-disease-ibd](https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/inflammatory-bowel-disease-ibd). Acessado em 18/10/2020.

WONG, C.C., ZHANG, L., WU, W.K., et al. Cathelicidin-encoding *Lactococcus lactis* promotes mucosal repair in murine experimental colitis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 32, n. 3, p. 609-619, 2017.

ZURITA-TURK M., MENDES S. B, PRÓSPERI C. C., BASTOS P. V, PECINI C. V., MELO P. T., CAETANO F. A.M., CARMONA C. M. D., MIYOSHI A. Attenuation of intestinal inflammation in IL-10 deficient mice by a plasmid carrying *Lactococcus lactis* strain. **BMC Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2020.