

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO

**“Efeito da suplementação materna com probiótico
(*Lactobacillus paracasei*) durante a prenhez e lactação no
desenvolvimento neurocomportamental da prole de
camundongos swiss”**

Rodrigo Fernandes Caldeira

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**“EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO MATERNA COM PROBIÓTICO
(*Lactobacillus paracasei*) DURANTE A PREENHEZ E LACTAÇÃO NO
DESENVOLVIMENTO NEUROCOMPORTAMENTAL DA PROLE DE
CAMUNDONGOS SWISS”**

RODRIGO FERNANDES CALDEIRA

Orientadora

Prof.*PhD.* Rosa Helena Luchese

Co-orientador

Dr. Roberto Laureano-Melo

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, no programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica – RJ
Julho de 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C146e CALDEIRA, RODRIGO FERNANDES, 1970-
EPRITO DA SUPLEMENTAÇÃO MATERNA COM PROBIÓTICO
(LACTOBACILLUS PARACASEI) DURANTE A PREENHIZ E
LACTAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO NEUROCOMPORTAMENTAL DA
PROLE DE CAMUNDONGOS SWISS / RODRIGO FERNANDES
CALDEIRA. - 2018.
67 f.

Orientadora: ROSA HELENA LUCHESE.
Coorientador: ROBERTO LAUREANO-MELO.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2018.

1. PROBIÓTICO. 2. LACTOBACILLUS. 3. SUPLEMENTAÇÃO
MATERNA. 4. PROLE. 5. ANSIEDADE E DEPRESSÃO. I.
LUCHESE, ROSA HELENA, 1957-, orient. II. LAUREANO
MELO, ROBERTO, 1987-, coorient. III Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. PROGRAMA DE PÓS
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. IV.
Título.

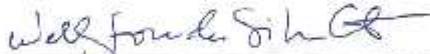
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

RODRIGO FERNANDES CALDEIRA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos.



Rosa Helena Luchese, *PhD*, PPGCTA/UFRRJ,
(Orientadora)



Wellington Silva Cortes, D.Sc. IB/UFRRJ



Silvia Regina Magalhães Couto Garcia, *Dr.^a*, Sc. UFRJ

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais Palmira e Raminô (*in memoriam*), às minhas irmãs Rita, Rosemary e Rosiane, meus irmãos Rogério, Rildo e Ramon, todos os sobrinhos, Eliene e minha amada filha Lara Caldeira.

AGRADECIMENTOS

**“E aprendi que se depende sempre
De tanta, muita, diferente gente
Toda pessoa sempre é as marcas
Das lições diárias de outras tantas pessoas
E é tão bonito quando a gente entende
Que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá
E é tão bonito quando a gente sente
Que nunca está sozinho por mais que pense estar.”
(Caminhos do Coração – Gonzaguinha)**

A música “Caminhos do Coração”, de Gonzaguinha, exprime tudo o que tenho vivenciado em minha vida pessoal e profissional. Percebo que, além da minha, há uma força imensurável que vem das pessoas que me cercam para me fazer acreditar e manter acesa a chama que alimenta minha capacidade de ser, de fazer e de sonhar. A todas essas pessoas, com quem tenho convivido e que contribuíram de modo significativo em minha formação, ofereço minha eterna gratidão.

A minha orientadora Professora Dra. Rosa Helena Luchese e meu co-orientador D.Sc. Roberto Laureano-Melo, pela confiança depositada a mim e a minha pesquisa. Ademais, pela sua parceria, paciência e, principalmente, pelas oportunidades de reflexão e aprimoramento.

Ao meu incansável irmão Rildo Caldeira, pelo incentivo dado, a força me passada durante essa batalha e também pelos momentos divertidos, alegres, descontraídos que me proporcionou durante minhas pequenas férias no Pará e Minas Gerais.

Aos meus irmãos, Rita, Rogério, Rosemary, Rosiane e Ramon, meus alicerces, pelas orações, pelo carinho, compreensão, pela minha ausência nas reuniões de família e pelos poucos momentos alegres que passamos juntos durante esse período.

Aos grandes mestres e colegas de trabalho em algumas oportunidades, que sempre acreditaram e sempre irão acreditar em mim Prof. Imar Araújo, Izabel Cristina, Caetano da Conceição e Prof. D.Sc Antonio Tavares, obrigado também pela ajuda dada no início desse projeto árduo.

Agradeço aos colegas de mestrado que proporcionaram riquíssima interação, experiências profissionais e de amizade.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos por todas as oportunidades em especial à coordenação (Profa. D.Sc. Maria Ivone) e a Secretária da pós (Prezada Lucimar Stock) pela amizade e confiança depositada em mim.

À Senhora Edinalva Barreto e ao Senhor João Marques, pelo carinho e o aconchego dado a minha filha e a mãe dela em sua residência.

Ao Gildásio Marques, pela contribuição no início dessa caminhada, a Janete, e Zeneide pelo carinho com minha filha Lara.

A Oziro e Eli pela amizade e palavras de incentivos para finalizar esse projeto vida.

A meu amigo Júlio (*in memoriam*), no qual aprendi muito com seu jeito descontraído e muito encorajador em todos os projetos de diversos alunos no Departamento. A Dona Glorinha e Dona Valéria pela amizade e pelos vários cafezinhos que tomamos juntos na Copa.

Ao meu grande amigo Ivan Bianco, colaborador da UFRRJ e vereador da cidade de Seropédica pela sua ajuda incansável para comigo, bem sabe ele das dificuldades que aqui enfrentei e espero um dia poder retribuir tudo que você fez por mim até mesmo no dia que antecedeu a minha defesa. OBRIGADO E GRANDE ABRAÇO

Aos meus amigos(as) Edna, Edilene, Elizete e Yuri, Leandro Capatto, Amanda Martins e Juarez que me ajudaram do início até o final dessa caminhada árdua.

E lógico, não iria esquecer de agradecer essa guerreira, minha ex Esposa (Eliene Caldeira), que na maioria das vezes, abandonastes seus projetos de vida para me apoiar em minhas caminhadas, sempre acreditando que um dia as nossas vidas iriam melhorar. OBRIGADO

A minha filha Lara Caldeira, pois a minha força de luta é você e sempre tentarei ser o seu melhor exemplo para ser seguido.

A todos que compõem a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-**UFRRJ**, por terem contribuído de alguma forma para a realização deste trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro, que me permitiu ter dedicação exclusiva na pesquisa em um certo período. Agradeço pela confiança depositada.

Ninguém caminha sozinho, ao longo da caminhada várias pessoas contribuíram para que este trabalho fosse concluído. A todas elas, os meus singelos agradecimentos!

RESUMO

CALDEIRA, Rodrigo Fernandes. **Efeito da suplementação materna com probiótico (*Lactobacillus paracasei*) durante a prenhez e lactação, no desenvolvimento neurocomportamental da prole de camundongos swiss.** 2018. 64p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Tanto a nutrição quanto a microbiota materna podem modular a saúde fetal. No entanto, não se sabe os impactos da suplementação com probióticos no comportamento emocional da prole. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar se a suplementação materna com bactérias lácticas é capaz de alterar parâmetros neurocomportamentais em prole de camundongos suíços. Para este propósito, camundongos prenhas (n = 6 cada, e ~ 35g) foram divididos aleatoriamente em dois grupos: controle e grupo tratado com probiótico. Estes animais foram tratados durante a gravidez e lactação com leite ou leite fermentado com *Lactobacillus paracasei* a uma concentração de 10^7 células / ml (p.o, diariamente). Após o término do tratamento, parte da progênie com 24 dias de vida foi submetida a eutanásia e o hipocampo foi dissecado para análise de RNA. Após completar 70 dias de vida, os demais filhotes foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais composta pelos seguintes protocolos: campo aberto, caixa escura clara, testes de labirinto em cruz elevado e suspensão em cauda. De acordo com os resultados, os animais cujas mães foram tratadas com leite fermentado tiveram uma redução na expressão de GAD 65 (19%, p = 0,006), GAD 67 (25%, p = 0,003) e subunidade $\alpha 3$ do receptor GABA_A (223%, p = 0,01) no hipocampo. Na fase adulta, a prole do grupo tratado apresentou maior tempo na área central no teste de campo aberto (62%, p = 0,04), menor latência para o lado claro no teste de caixa claro-escuro (252% p = 0,01) e menor número de comportamentos de tomada de decisão no teste do labirinto em cruz elevado (30%, p = 0,02). Nenhum resultado significativo foi encontrado no teste de suspensão da cauda. Estes resultados indicam que a suplementação materna com probiótico modula o sistema gabaérgico hipocampal da prole. Tais mudanças podem estar associadas à redução do comportamento semelhante à ansiedade ao atingir a idade adulta.

Palavras-chave: probiótico, *Lactobacillus*, suplementação materna, prole, ansiedade, depressão.

ABSTRACT

CALDEIRA, Rodrigo Fernandes. **Effect of maternal supplementation with probiotic (*Lactobacillus paracasei*) during pregnancy and lactation on the neurobehavioral development Swiss mice offspring.** 2018. 64p. Dissertation (Master in Food Science and Technology). Institute of Technology. Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018

Probiotics are living microorganisms which, when administered in suitable amounts, confer a health benefit on the host. Both nutrition and maternal microbiota can modulate fetal health. However, it is unknown whether probiotics could have a direct effect offspring emotional behavior. Thereby, the objective of our study was to evaluate whether maternal supplementation with acid lactic bacteria is able to alter neurobehavioral parameters of Swiss mice offspring. For this purpose, pregnant mice (n=6 each, and ~35g) were randomly divided into two groups: control and probiotic-treated group. These animals were treated during pregnancy and lactation with milk or milk fermented with *Lactobacillus paracasei* at a concentration of 10^7 cells/ml (*p.o.*, daily). After the end of the treatment, part of the progeny with 21 days of life was submitted to euthanasia, and the hippocampus was dissected for RNA analysis. After completing 70 days of life, the rest of the pups were submitted to a battery of behavioral tests composed of the following protocols: open field, light dark box, elevated plus maze and tail suspension tests. According to our results, animals whose mothers were treated with fermented milk had a reduction in the expression of GAD 65 (19%, $p = 0.006$), GAD 67 (25%, $p = 0.003$) and $\alpha 3$ subunit GABAA (223%, $p = 0.01$) in the hippocampus. In the adult phase, the offspring of the treated group had higher time in the central area in the open field test (62%, $p = 0.04$), lower latency to the light side in the light-dark box test (252% $p = 0.01$) and lower number of decision-making behaviors in the elevated plus maze test (30%, $p = 0.02$). No significant results were found in the tail suspension test. These results indicate that maternal supplementation with probiotic modulates offspring hippocampal gabaergic system. Such changes could possibly be associated with the reduction of anxiety-like behavior upon reaching adulthood.

Keywords: probiotic, *Lactobacillus*, maternal supplementation, offspring, anxiety, depression.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Critérios diagnósticos para depressão da American Psychiatric Association, 2005.

Tabela 02. Tipos de transtornos e ocorrências na população mundial.

Tabela 03. Estudos mostrando que a ansiedade pode trazer alguns pontos negativos para a mãe e a prole pós-parto,

Tabela 04. Espécies mais utilizadas de bactérias lácticas em preparações de probióticos.

Tabela 05. Mecanismos de interação probióticos/hospedeiro. A simbiose entre a flora e o hospedeiro pode ser otimizada por meio de intervenções farmacológicas ou nutricionais no ecossistema microbiano intestinal utilizando probióticos.

Tabela 06. Vantagens do uso de probióticos:

Tabela 07. Componentes da flora do trato gastrointestinal.

Tabela 08. Estudos de avaliação da suplementação de probióticos em distúrbios do sistema nervoso central.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.** Hipótese do Fenótipo Econômico.
- Figura 02.** Influências epigenéticas em humanos.
- Figura 03:** Principais regiões cerebrais envolvidas na regulação de emoções e detecção de ameaças.
- Figura 04.** Disbiose igual desequilíbrio. Fonte: <http://www.fhitsu.com.br/disbiose-intestinal-by-carol-grillo>
- Figura 05.** Órgãos/sistemas alvo para os quais as espécies de *Lactobacillus* têm efeito benéfico.
- Figura 06.** Principais mecanismos de ação dos probióticos.
- Figura 07.** Anatomia do trato gastrointestinal.
- Figura08.** Espécies de *Lactobacillus* utilizadas em aplicações benéficas para a saúde.
- Figura 09:** Os programas de microbiota intestinal auxiliam na saúde da mãe e do bebê.
- Figura 10:** Desenho experimental da programação materna com probióticos.
- Figura 11:** Teste da campo aberto.
- Figura 12:** Teste da caixa claro-escuro.
- Figura 13:** Teste do labirinto em cruz elevado.
- Figura 14:** Teste da suspensão pela cauda.
- Figura 15:** Representação esquemática dos procedimentos estatísticos adotados.
- Figura 16:** Expressão gênica hipocampal de TPH2, 5HT1a, TH, BDNF em camundongos com 24 DPN cujas mães foram tratadas com leite (controle) ou leite inoculado com *L. paracasei* (probiótico). Nessa avaliação, não foram verificadas diferenças significativas. N = 6.
- Figura 17:** Expressão gênica hipocampal de GAD 65, GAD 67, subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 5$ em camundongos com 24 DPN cujas mães foram tratadas com leite (controle) ou leite inoculado com *L. paracasei* (probiótico).
- Figura 18:** Avaliação da atividade exploratória e do comportamento semelhante à ansiedade em camundongos com 70 DPN cujas mães foram tratadas com leite (controle) ou leite inoculado com *L. paracasei* (probiótico) através do teste do campo aberto.
- Figura 19:** Avaliação do comportamento semelhante à ansiedade em camundongos com 71 DPN cujas mães foram tratadas com leite (controle) ou leite inoculado com *L. paracasei* (probiótico) através do teste da caixa claro-escuro.
- Figura 20:** Avaliação do comportamento semelhante à ansiedade em camundongos com 71 DPN cujas mães foram tratadas com leite (controle) ou leite inoculado com *L. paracasei* (probiótico) através do teste do labirinto em cruz elevado.
- Figura 21:** Avaliação do comportamento semelhante à depressão em camundongos com 73 DPN cujas mães foram tratadas com leite (controle) ou leite inoculado com *L. paracasei* (probiótico) através do teste da suspensão pela cauda.

LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SÍMBOLOS

μg – micrograma
 μL – microlitros
5HT1a - 5-hidroxitriptamina 1a
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro
cDNA – cido desoxirribonucléico complementar.
 CO_2 – Dióxido de carbono
CT –Limite do ciclo
DAC – Doenças do aparelho circulatório
DMS-V - DiagnosticandStatistical Manual of Mental Disorders
DNA – cido desoxirribonucléico
DNMT –Citosina-5-metiltransferases 1
DNTs – Doenças não transmissíveis
DPN – Dias pós-natal
EDTA – “Ethylenediaminetetraaceticacid” - cido etilenodiamino tetra-acético
g – gramas
GABA – cido gamma-aminobutírico
GAD 67 e 65 - Descarboxilase do ácido glutâmico
GI – Gastrointestinais
GRAS - Geralmente Reconhecidas como Seguras
HATs – Histona acetiltransferases
HDACs - Histona desacetilases
HPA – Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
ICD-10 - InternationalClassificationofDiseases
LUX - Produção de um fluxo luminoso uniformemente distribuído sobre uma superfície na proporção de 1 lúmen por m^2
mL – mililitros
MRS - De Man Rogosa e Sharpe
OMS – Organização Mundial de Saúde
ONU – Organização das Nações Unidas
PCR – Reação em cadeia da polimerase
pH – Potencial hidrogeniônico
PQS - Presunção Qualificada de Segurança
QV – Qualidade de vida
RDC - Resolução da diretoria colegiada
RNAm – cido ribonucleico mensageiro.
RT-PCR - Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
SAM - S-adenosil l-metionina
SAP - Stretchattendpostures – Comportamento em que o animal estica o corpo sem movimentar as tapas traseiras e volta a posição inicial ou movimenta-se com corpo esticado.
SNC – Sistema nervoso central
TAS - Transtorno de ansiedade social
TH - Tirosina hidroxilase
TPH2 - Triptofano hidroxilase-2
TRKB - Receptor da tirosina kinase B
UFC – Unidade formadora de colnia
FDA – FoodandDrugAdministration
 α_2 , α_3 e α_5 – Subunidades do receptor GABAA

SUMÁRIO

1	<u>INTRODUÇÃO</u>	15
2	<u>REVISÃO DE LITERATURA</u>	16
2.1.	Origem fetal das doenças	16
2.1.1	Teoria de Barker	17
2.2.	- Epigenética	18
2.3.	- Nutrigenômica e Nutrigenética	20
2.4	- Depressão	20
2.5	- Ansiedade	23
2.6	- Disbiose	24
2.7	- Probióticos	25
2.8	- Probióticos Psicobióticos	33
2.8.1	- Principais grupos de micro-organismos probióticos	35
2.8.2	Propriedade biológicas e alegações de saúde	36
2.8.3	- Uso de probióticos durante a prenhez e a lactação	37
3	<u>OBJETIVO</u>	41
3.1	Objetivos específicos	41
4	<u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	42
4.1	Animais	42
4.2	Microrganismo	42
4.3	Desenho experimental	42
4.4	Aspectos éticos	43
4.5	Procedimentos experimentais	43
4.5.1.	qRT-PCR	43
4.5.2.	Avaliação psicobiológica	44
4.5.2.1	Teste do campo aberto	45
4.5.2.2	Teste da caixa claro-escuro	45
4.5.2.3	Teste do labirinto em cruz elevado	46
4.5.2.4	Teste da Suspensão pela Cauda	47
4.5.2.5	Análise estatística	48
5	<u>RESULTADOS</u>	49
5.1	Expressão Gênica Hipocampal	49
5.2	Avaliação Comportamental	50
6	<u>DISCUSSÃO</u>	53
7	<u>CONCLUSÕES</u>	55
8	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	56

1 INTRODUÇÃO

O aumento substancial da prevalência de doenças não transmissíveis ou crônicas (DNT) tais como: Doenças Cardiovasculares (Enfarte Agudo do Miocárdio, Hipertensão e Acidente Vascular Cerebral), Doenças Oncológicas, Doenças Respiratórias Crônicas (Doença Crônica de Obstrução Pulmonar e Asma) e Diabetes, observadas nas últimas décadas, têm orientado mudanças específicas no meio ambiente como uma possível causa deste aumento. . Entre os fatores ambientais, a dieta é um influenciador crucial da saúde da população. De acordo com a Teoria da origem fetal das doenças, também conhecida como Teoria de Barker, em homenagem ao epidemiologista inglês David Barker, a maioria das doenças que ocorrem na fase adulta se originam ainda no ambiente intrauterino. Esse processo de adaptação morfofuncional é conhecido como programação fetal. Com o passar dos anos, a Teoria de Barker ganhou força e foi estendida para outros grupos de doenças, tais como as psicopatologias.

Diversas pesquisas estão sendo realizadas quanto aos distúrbios do eixo microbiota-intestino-cérebro na fisiopatologia de doenças psiquiátricas e gastrointestinais comórbidas. Isso é extremamente provocativo, pois abre a possibilidade de controle na alimentação voltado para a microbiota intestinal, uma vez que há evidências de que a manipulação microbiana pode alterar a saúde e o bem-estar do hospedeiro. A atenção na atualidade está sendo direcionada para intervenções nutricionais variadas que podem direcionar especificamente uma composição de microbiota alterada e metabolismo no intestino.

Alguns estudos revelam que a microbiota gastrointestinal desempenha um papel importante no funcionamento digestivo, metabólico e imune. Esses micro-organismos contribuem para o metabolismo, ajudando a hidrolisar polissacarídeos complexos que são ingeridos como parte na dieta e são críticos para o desenvolvimento normal do sistema imunológico. Estudos recentes revelam a importância da microbiota intestinal para a função do sistema nervoso central (SNC). A comunicação bidirecional entre o cérebro e o intestino é reconhecida há muito tempo. Alguns estudos pré-clínicos com camundongos relacionaram alterações comportamentais e neuroquímicas no sistema nervoso central com déficits ou mudanças nessa carga microbiana. Além disso, a suplementação de probióticos em camundongos tem demonstrado uma mudança significativa no comportamento, com alterações relacionadas à neuroquímica central.

Com a continuação dos indicadores biológicos, sugere-se que micro-organismos probióticos, quando administrados em quantidades adequadas, são benéficos para a saúde do hospedeiro, podendo ter efeitos favoráveis contra os sintomas de transtornos mentais. Essa ideia é apoiada em evidências de ensaios pré-clínicos, que demonstram os efeitos da suplementação probiótica sobre o comportamento emocional em modelos animais são relevantes para desfechos psicológicos, como depressão e ansiedade.

Durante a prenhez e a lactação, tem-se um período especificamente importante para a programação da condição na fase adulta e a suplementação com uma dieta controlada pode ser uma saída para evitar diversas doenças não transmissíveis ou crônicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Origem fetal das doenças

A epidemiologia é uma ciência que estuda os diferentes fatores que intervêm na difusão e propagação de doenças, sua frequência, seu modo de distribuição, sua evolução e a colocação dos meios necessários a sua prevenção a nível da população. Na busca de descobrir métodos para combater a crescente incidência de doenças que não são transmissíveis ou doenças crônicas, tais como: doenças cardiovasculares (infarto agudo do miocárdio, hipertensão e acidente vascular cerebral), doenças oncológicas, doenças respiratórias crônicas (doença crônica de obstrução pulmonar e asma) e diabetes, surgiram várias novas teorias sobre o desenvolvimento do conjunto de causas capazes de produzir uma doença. Um exemplo pertinente é a hipótese publicada pelo epidemiologista inglês David Barker em 1995, que postula a origem pré-natal e inicial do desenvolvimento da doença de aparecimento na fase adulta, destacando a importância do ambiente materno. Esta teoria foi sujeita a críticas, no entanto, gradualmente ganhou aceitação (LINDBLOM et al., 2015).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera estas doenças uma “epidemia emergente”, pois são consideradas as principais causas de óbitos no mundo e têm gerado elevado número de mortes prematuras, perda de qualidade de vida (QV) com alto grau de limitação nas atividades de trabalho e de lazer, além de impactos econômicos para as famílias, comunidades e a sociedade em geral, agravando as iniquidades e aumentando a pobreza (OMS/WHO, 2011, DUCAM et al., 2012, OLIVEIRA et al., 2017). Atualmente, esse dado representam dois terços da mortalidade mundial. Segundo estatísticas recentes, as doenças cardiovasculares são responsáveis pela maioria das mortes mundiais (17,5 milhões de pessoas por ano), seguidas das doenças cancerígenas (8,2 milhões), doenças respiratórias (4 milhões) e diabetes (1,5 milhões). (OMS, 2011). De acordo com estes valores e observando o constante crescimento de mortes devido às DNTs o ex-secretário-geral da ONU, Ban Ki-moon (2007-2016), declarou que "as doenças não transmissíveis constituem um dos principais desafios do Século XXI para a saúde humana".

Atingindo indivíduos de todas as camadas socioeconômicas e, de forma mais intensa, aqueles pertencentes a grupos vulneráveis, como os idosos, os de baixa escolaridade e renda, as DNTs, constituem um problema de saúde de maior magnitude no Brasil e em outros países. As DNTs, são responsáveis por 72,0% das causas de óbitos, com destaque para doenças do aparelho circulatório (DAC) (31,3%), câncer (16,3%), DM (5,2%) e doença respiratória crônica (5,8%) (MALTA et al., 2011, OLIVEIRA et al., 2017).

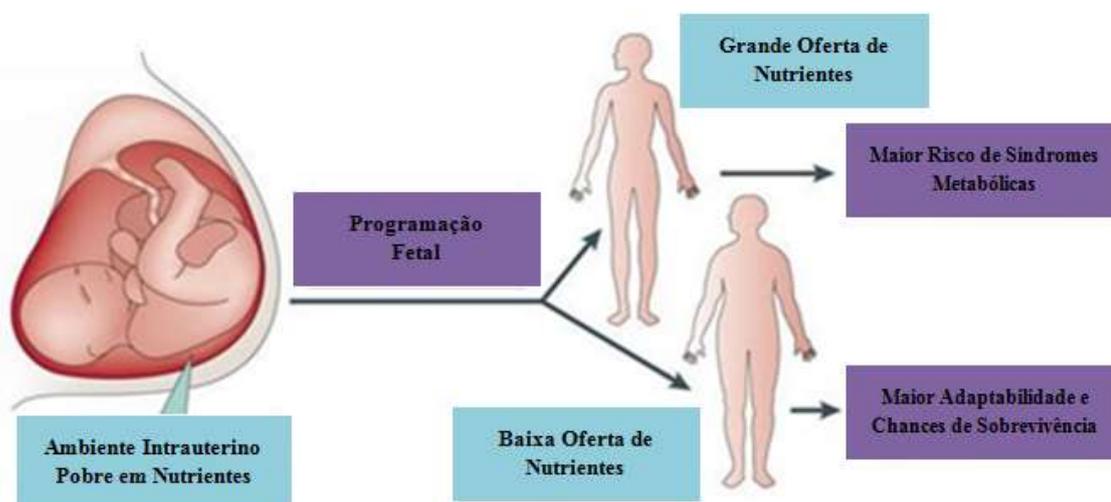
Com base nesse cenário em setembro de 2011, no compromisso dos líderes mundiais na Assembleia da ONU, foram definidas ações concretas para o enfrentamento dessas doenças. Já em 2013, a Assembleia Mundial da Saúde adotou um quadro abrangente de monitoramento global com 25 indicadores e nove metas voluntárias globais para 2025, além de aprovar o Plano de Prevenção e Controle de Doenças Não Transmissíveis 2013-2020. Dentre as metas definidas, consta a redução da mortalidade por DNT em 25%, e redução dos fatores de risco (tabaco, álcool, sal, inatividade física) e o acesso a medicamentos, ao aconselhamento e a tecnologias para tratamento de DNT. O acesso à assistência aos portadores de DNT, incluindo consultas médicas, cuidados na atenção primária, acesso a medicamentos, testes de laboratório, prática clínica e aconselhamento, resulta em benefícios na assistência aos portadores de DNT e melhoria da qualidade de vida (CARVALHO et al., 2017).

2.1.1 Teoria de Barker

No final da década de 1980, David Barker, epidemiologista britânico, identificou relações entre neonatos com baixo peso, mas que conseguiam sobreviver, poderiam ter mais riscos de desenvolver doença coronariana na idade adulta. Com isso, os estudos intensificaram mais sobre a hipótese de que influências adversas durante a vida intra-uterina e desenvolvimento inicial poderiam levar a alterações fisiológicas e metabólicas permanentes, o que aumenta o risco de doenças na idade adulta (BARKER, e OSMOND, 1986, DE BOO e HARDING, 2006, MANN et al., 2016, HEANEY, 2016). A hipótese foi chamada de "origens fetais das doenças " na maioria da vezes como "Teoria de Barker" ou "Teoria das Origens Fetais". (BARKER, e OSMOND, 1986, DE BOO e HARDING, 2006, MANN et al., 2016, HEANEY, 2016).Várias condições foram associadas a essa teoria, como hipertensão, doença cardíaca isquêmica e diabetes (POULTER, 2001), bem como acidentes vasculares cerebrais e obesidade (KIMM, 2004). No entanto, a hipótese foi encarada com ceticismo às vezes devido à falta de evidência composta dos mecanismos envolvidos na relação. Dessa forma, os links identificados eram em grande parte observacionais e fatores como a prematuridade ou gestações múltiplas poderiam influenciar os resultados.

Embora ainda não tenha sido comprovada, foram propostos vários mecanismos que apoiem a Teoria de Barker. De acordo com De Boo e Harding (2006), o mecanismo mais provável envolvido é o processo de programação fetal pelo qual insultos ou estímulos específicos durante períodos críticos ou sensíveis de desenvolvimento resultam em consequências adversas a longo prazo e irreversíveis que afetam o desenvolvimento subsequente. Estes podem estar relacionados à nutrição alterada do feto, à exposição ao excesso de glicocorticóides, à hipótese do fenótipo econômico, as respostas adaptativas preditivas, hipóteses da insulina fetal, vínculos genéticos, vínculos epigenéticos, efeitos intergeracionais e eventos periconcepcionais (BARKER, e OSMOND, 1986, DE BOO e HARDING, 2006, MANN et al., 2016).

De acordo com a hipótese do fenótipo, a plasticidade durante o desenvolvimento fetal promove uma oportunidade para que o organismo em desenvolvimento "se adapte" ao futuro ambiente adulto, o que proporcionaria uma vantagem de sobrevivência à longo prazo. No entanto, em situações em que o ambiente fetal não coincide com o ambiente adulto pode predispor ao desenvolvimento de síndromes metabólicas na fase adulta, incluindo a diabetes tipo II (WALKER & HO, 2012). Conforme figura 01 da Hipótese do Fenótipo Econômico.



Hipótese do Fenótipo Econômico

Figura 01: Adaptado de (WALKER & HO, 2012).

Daniele (2007), sugere que para a hipertensão, parece que a combinação de um menor peso ao nascer, seguido de um aumento rápido de peso nos primeiros seis meses de vida, influencia a pressão arterial mais alta aos três anos de idade. Novamente, a questão é que a evidência não é suficientemente forte para entender e apoiar a mecânica postulada definitivamente no presente. Uma condição em que a pesquisa sobre o ambiente intra-uterino e o desenvolvimento fetal que se seguiu poderia potencialmente fornecer tangibilidade e validade para a compreensão dos mecanismos envolvidos na Teoria de Barker, a síndrome de transfusão Síndrome de Transfusão Feto-Fetal e sua relação com estados de doença subsequentes.

Uma característica crítica das doenças que ocorrem através da Teoria de Barker é a irreversibilidade nutricional dos distúrbios de longa duração. Além de certos pontos críticos no desenvolvimento, a repleção de nutrientes completa não é capaz de compensar ou reverter a inadequação precoce. Essa irreversibilidade é o principal estímulo para uma melhor elucidação desses distúrbios, levando à ênfase no imperativo da nutrição preventiva no início da vida.

2.2. - Epigenética

A epigenética é um campo relativamente novo que estuda conjunto das modificações nucleares herdadas e que modulam a expressão gênica por uma ou mais gerações, mas não envolvem modificações da sequência do DNA.(KARAGIANNIS, 2012, LINDBLOM et al., 2015). A maioria das mudanças epigenéticas ocorrem em momentos específicos da vida de um ser humano, desde a fase intra-uterina, passando pelo desenvolvimento do recém-nascido, em seguida pela puberdade e na terceira idade.

Os principais fatores epigenéticos são a metilação de DNA; as alterações pós-traducionais de histonas, como metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, dentre outras; alguns RNAs não codantes; e remodeladores de cromatina. Dependendo da combinação dessas modificações, a cromatina se encontra numa configuração mais aberta (eucromatina) ou mais fechada (heterocromatina), estando assim relacionadas ao controle da expressão gênica (FRANCO, 2017).

Hoje, é sabido que as modificações epigenéticas são sensíveis a pressões ambientais e até mesmo sociais, representando assim, a fronteira entre o meio ambiente e a expressão dos genes. Assim, as informações contidas no epigenoma (conjunto de caracteres epigenéticos) de um indivíduo são únicas (VIDAKI et al., 2013, TURNER et al., 2015, MATOS, R. W. M., 2017).

Por se apresentar como uma nova maneira de identificar um indivíduo e suas características, a epigenética começa a despontar como um ramo da Genética Forense. Estudos recentes têm demonstrado as possibilidades de investigação de características epigenéticas para a diferenciação de gêmeos monozigóticos, estimativa da idade de indivíduos, identificação de tipos teciduais encontrados em cenas de crime, validação de amostras de DNA encontradas em cenas de crime, entre outras (KAYSER, 2013, MATOS, R. W. M., 2017).

Os mecanismos epigenéticos envolvem a modificação da expressão gênica sem modificação na sequência de DNA. Os mecanismos epigenéticos incluem metilação do DNA, modificações pós-traducionais de histonas e interferência por miARN. As proteínas de cromatina associadas com DNA ou histonas podem ser ativadas ou silenciadas. A modificação pós-tradução dos aminoácidos que compõem as proteínas das histonas inclui acetilação por histona acetiltransferases (HATs) ou histona desacetilases (HDACs) ou metilação em locais específicos nas caudas das histonas. A metilação do DNA ocorre através de metiltransferases de DNA (DNMT) que utiliza S-adenosil l-metionina (SAM) como doador de metilo, principalmente em locais de CpG para converter citosina em 5-metilcitosina (SPEYBROECK, 2002; LINDBLOM et al., 2015).

No entanto, de acordo com os hábitos de vida e o ambiente social em que o indivíduo está inserido, podem ocorrer algumas alterações químicas no DNA e nas proteínas que o envolvem, afetando as funções de alguns genes. Desta forma, acontecem alterações epigenéticas que podem ser transmitidas para os descendentes desta pessoa, por exemplo. A alimentação, a exposição à poluição, o uso de drogas, a prática de exercícios, dentre outros fatores ambientais também podem servir para alterar algumas funções dos genes, deixando "marcas epigenéticas" que poderão ser herdadas pelas gerações futuras daquele indivíduo (Figura 2).

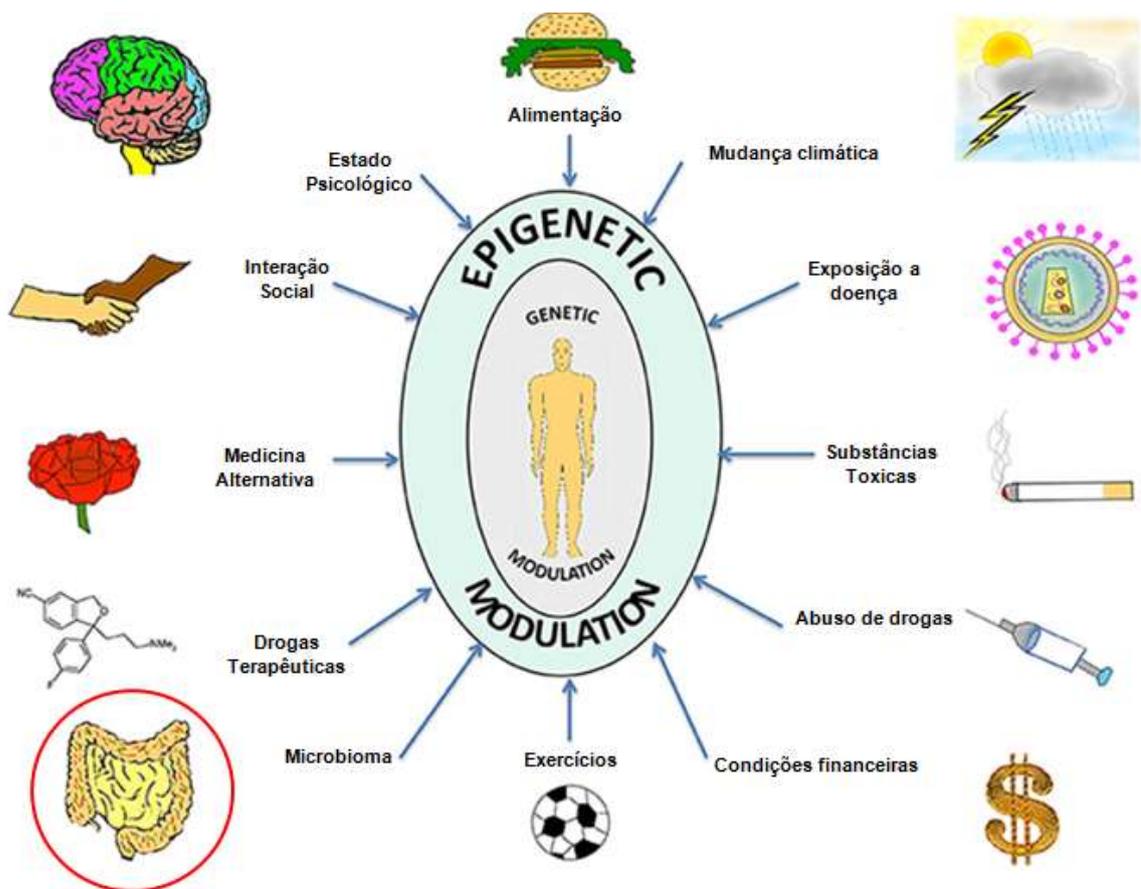


Figura 2: Influências epigenéticas em humanos. (Fonte Adaptada: http://www.frontiersin.org/files/Articles/105911/fcell-02-00049-HTML/image_m/fcell-02-00049-g001.jpg)

2.3. - Nutrigenômica e Nutrigenética

A Nutrigenômica (ou genômica nutricional) surgiu neste contexto, estudando como alimentos, nutrientes e outros compostos bioativos ingeridos influenciam o genoma. A nutrigenômica pode ser subdividida em áreas específicas como proteômica, metabolômica e transcriptômica, complementares entre si: alterações no RNA mensageiro (transcriptômica) e as proteínas correspondentes (proteômica) controlam o transporte de determinados nutrientes e metabólitos (metabolômica) no caminho bioquímico. A nutrigenética estuda como a constituição genética de uma pessoa afeta sua resposta à dieta. Vislumbra-se que os avanços tanto da nutrigenômica e da nutrigenética foram de fundamental importância para o estabelecimento de intervenções dietéticas personalizadas, com o objetivo de se reduzir o risco de doenças e promover a saúde (KAPUT e RODRIGUEZ, 2004),

2.4 - Depressão

Considerado como um problema significativo para a saúde pública devido à sua alta prevalência, a depressão é um fenômeno muito complexo e que traz intenso sofrimento na vida das pessoas acometidas, de seus familiares, amigos e comunidade. É caracterizada pelo prolongamento de sintomas depressivos e variação de humor. A pessoa acometida por esse transtorno tem a capacidade de ver o mundo e a realidade alterada (SILVA, et al., 2015).

A etiologia da depressão é complexa, envolvendo fatores psicossociais, genéticos e biológicos. Entre os fatores psicossociais, os primeiros aparecem após algum evento estressante, e esse estresse produz mudanças de longo prazo na fisiologia do cérebro. Essas mudanças podem produzir variações no nível estrutural e no funcionamento de diferentes áreas do cérebro. Entre os fatores genéticos envolvidos na doença depressiva, cerca de 200 genes estão relacionados ao transtorno depressivo. Dentro desses fatores biológicos, há evidências de alterações ao nível de neurotransmissores, citocinas e hormônios, cujas ações induzem mudanças estruturais e funcionais no sistema nervoso central, no sistema imunológico e no sistema endócrino, o que aumenta o risco de sofrer depressão. É uma doença mental caracterizada por profunda tristeza e perda de interesse; bem como uma ampla gama de sintomas emocionais, cognitivos, físicos e comportamentais. Esses sintomas incluem o choro, a irritabilidade, a retirada social, a falta de libido, a fadiga e a diminuição da atividade, a perda de interesse e o gozo das atividades no cotidiano, bem como os sentimentos de culpa e inutilidade. Além disso, os sentimentos de auto-estima são baixos, há uma perda de confiança, sentimentos de desamparo e em grande parte da população que sofre de grandes depressões há ideias suicidas, tentativas de auto-agressão ou suicídio (PÉREZ-PADILLA et al., 2017).

Na tabela 01 são citados os critérios de diagnóstico para depressão no manual, Diagnosticand Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-V) (19), e a International Classification of Diseases (ICD-10), que geralmente concordam em vários pontos.

O transtorno de depressão geralmente é recorrente e, muitas vezes, o início de um episódio depressivo está relacionado à presença de eventos ou situações estressantes.

Tabela 01. Critérios diagnósticos para depressão da American Psychiatric Association, 2005.

- Presença de 5 ou mais dos seguintes sintomas, diariamente por um período de 2 semanas, dos quais um deles deve ser 1 ou 2:
- Modo depressivo ou irritável (tristeza profunda).
- Diminuição do interesse em atividades prazerosas e na capacidade de experimentar prazer (anedonia).
- Aumento significativo ou perda de peso (alteração de > 5% em um mês).
- Insônia ou hipersomnia.
- Agitação ou retardo psicomotor.
- Fadiga ou perda de energia.
- Sentimentos de inutilidade ou culpa excessiva.
- Diminuição da capacidade de pensar ou se concentrar.
- Pensamentos recorrentes de morte ou suicídio.

Fonte: (PÉREZ-PADILLA et al., 2017).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), estima que a depressão é responsável por 4,3% da carga global das doenças e está entre as maiores causas de incapacidade no mundo, particularmente para as mulheres. Esta desordem afeta aproximadamente o dobro de mulheres em comparação com homens. De acordo com a OMS indica que 350 milhões de pessoas pelo mundo sofrem de depressão, um em cada dez adultos sofrem de depressão, e aproximadamente 60 % desses indivíduos não recebem a ajuda que precisa, sendo que o tratamento reduz os sintomas em mais de 50 % dos casos (PÉREZ-PADILLA et al., 2017). No Brasil, a OMS estima que 5,8% da população nacional é afetada pela depressão, o que coloca o país no quarto lugar com a maior prevalência do problema de saúde. O ranking é liderado pela Ucrânia, com 6,3% da população em depressão. Estônia, Estados Unidos e Austrália estão na segunda posição, com 5,9%. (WHO, 2017).

A exposição à depressão materna pré-natal aumenta a susceptibilidade à depressão na prole (PAWLBY et al., 2009; PEARSON et al., 2013) e associa-se a um aumento do comportamento neurocomportamental (MIAN, 2005), cognitivo (SOHR-PRESTON E SCARAMELLA, 2006) e problemas sócio-emocionais (LUNDY et al., 1996). A depressão materna pré-natal também está associada a níveis elevados de cortisol materno (DAVIS et al., 2007) que, por sua vez, prevê uma amígdala aumentada (BUSS et al., 2012, QIU et al., 2015). O aumento do volume de amígdala está associado à depressão (LUPIEN et al., 2011; HOLMES et al., 2012). De fato, a depressão na idade adulta foi proposta como preditor do estado mental da prole (MARS et al., 2015).

Nos últimos anos, os probióticos receberam atenção significativa por sua ampla gama de usos clínicos, que vão desde distúrbios gastrointestinais (GI) até doenças auto-imunes e condições da pele (ZUCCOTTI et al., 2008). Vários estudos exploraram o vínculo entre microflora intestinal e distúrbios do humor, investigando o papel do eixo gut-cérebro na fisiopatologia da depressão. É teorizado que as bactérias intestinais desempenham um papel importante na sinalização bidirecional entre o cérebro e o intestino, pelo qual o efeito emocional influencia a função GI enquanto a saúde GI altera a função cerebral (SCHMIDT, 2015). A interrupção do eixo do intestino-cérebro é, portanto, associada a doenças físicas e neurológicas. Além disso, uma pesquisa relativamente nova delineou o papel da desregulação imune como parte da patogênese da depressão (LEONARD, 2010). Como tal, as propriedades

anti-inflamatórias e imuno-reguladoras bem documentadas dos probióticos (ISOLAURI et al., 2001) oferecem esperança para enfrentar uma das causas subjacentes da depressão com o objetivo de induzir uma remissão de longo prazo. Conforme mostra a figura 03 abaixo, ensaios pré-clínicos em modelos animais descobriram que o consumo de probióticos regula negativamente o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (pensado para ser hiperativo na depressão) (AIT-BELGNAOUI et al., 2014), promove a biossíntese de GABA (que se sabe reduzir em pacientes deprimidos) (DHAKAL et al., 2012) e aumenta os níveis de serotonina através do aumento da produção de triptofano, um precursor de serotonina (DESBONNET et al., 2008).

Com evidências crescentes sobre os benefícios dos probióticos em uma série de doenças, houve um aumento no número de ensaios clínicos que examinam sua aplicação em doenças de saúde mental, como a depressão. Os resultados de uma meta-análise anterior indicaram que as formulações probióticas têm um impacto psicológico positivo (HUANG et al., 2016) e podem oferecer uma mudança de paradigma no tratamento da depressão como um complemento da terapia padrão ou como um autônomo tratamento. Este artigo teve como objetivo fornecer uma metanálise atualizada sobre o tópico e delinear as direções para futuras pesquisas (NG et al., 2017).

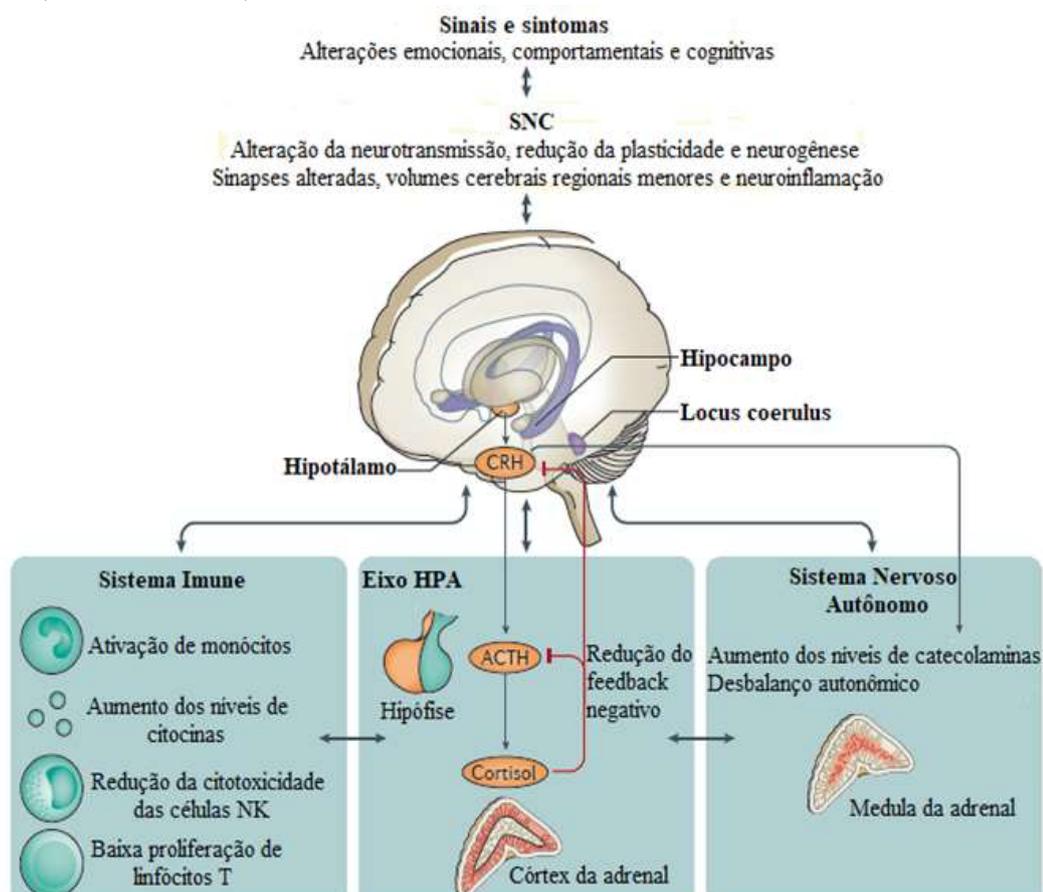


Figura 03: Principais regiões cerebrais envolvidas na regulação de emoções e detecção de ameaças. Nesse modelo, o medo e a ansiedade mediados pela amígdala são regulados através de conexões bidirecionais originadas do córtex pré-frontal ventromedial e do córtex cingulado anterior. A amígdala também integra informações mnemônicas do hipocampo e de consciência do córtex pré-frontal ventromedial. Regiões como a ínsula são inervadas reciprocamente pelo hipocampo e amígdala, sendo importante na ativação de respostas comportamentais referentes à ansiedade, como vigilância e apreensão. Modificado de (OTTE et al., 2016).

2.5 - Ansiedade

Definida como um incômodo desagradável interno, que interfere no humor, deixando a pessoa com uma sensação desconfortável, uma inquietação interna junto às percepções negativas sobre o futuro e manifestando sintomas somáticos e fisiológicos, como sudorese, tensão muscular, tonturas, entre outros, e sintomas psíquicos, por exemplo, apreensão e desconforto mental (DALGALARRONDO, 2009, MUNIZ, FERNANDES, 2016). Além disso, a ansiedade é considerada um estado psicológico e fisiológico, caracterizada por aspectos cognitivo, somático, emocional e comportamental (SELIGMAN et al., 2001; CRASKE et al., 2009). Trata-se de uma condição orientada para o futuro, acompanhada de uma apreensão relacionada com a percepção de falta de controle e previsão de eventos potencialmente aversivos. Já o medo é uma resposta de alarme ao perigo presente ou iminente (BARLOW, 2002).

Os transtornos de ansiedade (transtorno do pânico, fobia específica, fobia social, transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno de estresse pós-traumático, transtorno de ansiedade generalizada) são condições comuns e incapacitantes que começam principalmente durante a infância, adolescência e início da fase adulta. Eles diferem da ansiedade transitória de desenvolvimento normativa ou induzida pelo estresse ao serem marcados (ou seja, fora de proporção com a ameaça real presente) e persistentes, prejudicando o funcionamento diário. A maioria dos distúrbios de ansiedade afeta quase duas vezes mais mulheres do que homens. Eles costumam concorrer com a depressão, uso de substâncias como álcool e outras drogas e distúrbios de personalidade. Os transtornos de ansiedade também apresentam grande comorbidade com condições físicas, tais como: associação com alteração da tiroide, doenças respiratórias, doenças gastrointestinais, artrite, enxaqueca e alergias. Se não tratada, os transtornos de ansiedade tendem a se repetir cronicamente. Os tratamentos psicológicos, particularmente a terapia comportamental cognitiva, bem como tratamentos farmacológicos, como os inibidores seletivos da recaptação da serotonina e os inibidores da recaptação da serotonina-noradrenalina, são efetivos e sua combinação pode ser mais eficaz do que o tratamento individualizado (CRASKE; STEIN, 2016).

Transtorno de ansiedade social (TAS) é caracterizada por um medo intenso e persistente de situações sociais ou de desempenho, onde o indivíduo é exposto a pesquisa minuciosa de outros possíveis (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION [APA], 2013). TAS é reconhecida como uma prevalência, complexa, e desativação de desordem, que se não tratada, é incessante (STEIN & STEIN, 2008). Indivíduos com TAS possuem dificuldades de ter controles financeiros, estabilidade de emprego, desempenho acadêmico e em geral problemas de saúde mental (por exemplo, (RUSCIO et al., 2008). Estas dificuldades são na maioria das vezes são agravados por um alto grau de comorbidade com outros diagnósticos.

De acordo com o Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais (DSM-5, 2013), existem 12 transtornos de ansiedade, conforme especificado abaixo.

- Transtorno de ansiedade de separação;
- Mutismo seletivo;
- Fobia específica;
- Transtorno de ansiedade social (fobia social);
- Transtorno de pânico;
- Especificador de ataques de pânico;
- Agorafobia;
- Transtorno de ansiedade generalizada;
- Transtorno de Ansiedade Induzido por Substância/Medicamento;
- Transtorno de ansiedade devido a outra condição médica;

- Outro transtorno de ansiedade especificado;
- Transtorno de ansiedade não especificado.

E os que mais atingem a população mundial são citados na tabela 02.

Tabela 02. Tipos de transtornos e ocorrências na população mundial.

Transtorno	%	Ref.
Fobia específica	6-12	(BURSTEIN et al., 2012)
Ansiedade Social	10	(BAXTER et al., 2013)
Ansiedade generalizada	3-5	(BAXTER et al., 2013)
Pânico	2-5	(BAXTER et al., 2013)
Ansiedade de separação	2-3	(BAXTER et al., 2013)
Agorafobia	2	(BAXTER et al., 2013)
Mutismo seletivo	0,7-0,8	(BAXTER et al., 2013)

Fonte: (CRASKE; STEIN, 2016)

Indivíduos com transtornos de ansiedade são excessivamente temerosos, ansiosos ou evitam continuamente possíveis ameaças percebidas no ambiente (por exemplo, situações sociais ou locais desconhecidos) ou internas (por exemplo, sensações corporais incomuns). A resposta está fora de proporção com o risco real ou o perigo representado. (CRASKE; STEIN, 2016).

O medo e a ansiedade são comuns no cotidiano para ser diagnosticado como um transtorno de ansiedade, o medo e a ansiedade são marcados (excessivos ou desproporcionais à ameaça real colocada), persistentes e associados a deficiências nas áreas sociais, ocupacionais ou outras áreas importantes de funcionamento (CRASKE et al., 2009, CRASKE; STEIN, 2016).

Alguns estudos comprovam que a ansiedade pode trazer diversos pontos negativos na mãe e na prole pós-parto, conforme tabela abaixo.

Tabela 03. Estudos mostrando que a ansiedade pode trazer alguns pontos negativos para a mãe e a prole pós-parto.

Pontos negativos	Referência
• Baixos níveis de autoconfiança	Recket al., 2012
• Aumento da fadiga	Taylor e Johnson, 2013
• Insônia	Warren et al., 2006
• Choro excessivo	Petzoldt et al., 2014
• Pouco compromisso social	Feldman et al., 2009
• Resistência ao novo	Recket al., 2013
• Dificuldades em socializar	Barker et al., 2011
• Baixa função cognitiva	Keimet al., 2011
• Alteração nas funções motoras	Pinheiro et al., 2014

Fonte: (DENNIS et al., 2017)

2.6 - Disbiose

Segundo Chan et al. (2013), a disbiose é denominada como uma alteração indesejável da microbiota que resulta em um desequilíbrio entre as bactérias protetoras e patogênicas. Além de promover um estado no qual a microbiota produz efeitos nocivos, promovendo mudanças qualitativas e quantitativas na microbiota intestinal em si, em suas atividades metabólicas e em sua distribuição local (HAWRELAK et al., 2004, CONRADO et al., 2018).

DISBIOSE = DESEQUILÍBRIO



Figura 04. Disbiose igual desequilíbrio. Fonte: <http://www.fhits.com.br/disbiose-intestinal-by-carol-grillo>

Várias são as causas que causam a disbiose intestinal, dentre delas, pode se destacar: pH intestinal, o estado imunológico do hospedeiro, a má digestão, o tempo de trânsito intestinal, o estresse, a disponibilidade de material fermentável, as disfunções hepatopancreáticas, uso indiscriminado de antibióticos, de anti-inflamatórios hormonais e não hormonais, a excessiva exposição às toxinas ambientais (ALMEIDA et al., 2009, CONRADO et al., 2018).

Dessa forma, surgem alimentos com a utilização não só de saciar a fome e fornecer energia ao corpo, mas também como forma de prevenção ao desenvolvimento de patologias que são os prebióticos, probióticos e simbióticos. Probiótico é um suplemento alimentar microbiano vivo que afeta de forma benéfica o animal hospedeiro por meio de melhoria no balanço microbiano intestinal. O termo prebiótico foi empregado por Gibson & Roberfroid (1995) para designar "Ingredientes nutricionais não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro estimulando seletivamente o crescimento e atividade de uma ou mais bactérias benéficas do cólon, melhorando a saúde do seu hospedeiro". O termo simbiótico é dado a produtos que associam os prebióticos com os probióticos a fim de intensificar os efeitos dos dois componentes.

Também conhecidos como alimentos funcionais, que uma alternativa de tratamento, prevenção e controle da disbiose intestinal por usar a importância da funcionalidade do trato gastrointestinal como princípio básico, seguido pela especificidade bioquímica, terapêutica voltada ao paciente e não à patologia, estabilidade nutricional, biodisponibilidade de nutrientes e a intervenção de fatores externos à saúde orgânica (GAVANSKI, 2015, CONRADO et al., 2018).

2.7 - Probióticos

Com a mudança da sociedade em seu atual estilo de vida saudável, a procura por alimentos que tragam benefícios a saúde fez com que a indústria de alimentos enfrentasse um grande desafio em atender essa demanda. Com isso a indústria tem investido em novas tecnologias para o desenvolvimento de produtos funcionais (BIGLIARDI; GALATI, 2013).

Uma abordagem atual sugere que os alimentos funcionais estabelecerão no futuro, uma nova relação entre alimentos e saúde no dia-a-dia das pessoas (BALLAI; LANCIANI, 2012). Conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), alimentos

funcionais são alimentos ou ingredientes que alegam propriedades funcionais ou de saúde, que além de atribuírem funções nutricionais básicas, produzem efeitos metabólicos e ou fisiológicos, devendo ser seguros para o consumo humano sem supervisão médica (ANVISA, 1999, ROBERFROID, 2007, WENDLING, WESCHENFER, 2013).

No início de 1900, foi dado o primeiro nome para o que nos dias atuais são chamados de probióticos, nas obras de Ilya Mechnikov, também conhecido como Élie Metchnikoff, (1845-1916). Ele nomeou como "ANTIBIOSE", que mostrava a inibição do crescimento e atividade de um microrganismo por outro (FRIC, 2007). Esse renomado microbiologista Russo, Prêmio Nobel por seu trabalho em fagocitose em 1908, é considerado o pai dos probióticos modernos. Seus estudos sobre probióticos se basearam nas observações de Stamen Grigorov (1878-1945), um microbiologista búlgaro, que documentou os benefícios para a saúde através do consumo de iogurte búlgaro e identificou o organismo ativo neste alimento básico como *Lactobacillus bulgaricus*, redenominado *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. Metchnikoff levantou a hipótese que camponeses búlgaros possuíam a vida longa e saudável devido ao consumo de produtos lácteos fermentados e que o iogurte era o principal produto responsável por organismos necessários para proteger o intestino dos efeitos prejudiciais provocado pelas bactérias patogênicas (FRIC, 2007, HUME, 2011, CHONG, 2014).

No entanto, a produção, o consumo e as qualidades benéficas a saúde através do consumo de iogurte também eram bem conhecidas pelos povos do Oriente Médio e da Ásia e são anteriores a essas observações mais modernas, por volta de 5.000 anos antes das observações de Metchnikoff (HUME, 2011).

O termo "probióticos", que significa "para a vida", em grego, em oposição aos "antibióticos", "contra a vida", foi utilizado pela primeira vez em 1965 para descrever qualquer substância ou organismo que seja benéfico no equilíbrio da microflora intestinal no sistema (LILLY e STILLWELL, 1965, CHONG, 2014). A Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura definem os probióticos como "micro-organismos vivos, que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício a saúde do hospedeiro" (IANNITTI e PALMIERI, 2010, BERMUDEZ-BRITO et al., 2012 REDMAN et al., 2014). Embora exista um esforço e alinhamento internacional para evitar que essa definição abra margens para outras interpretações que possam levar o consumidor ao erro, essa ainda é a definição mais aceita pela comunidade científica. Na determinação de uma substância como probiótico, alguns critérios devem ser examinados: relação temporal; força de relacionamento; resposta a dose; replicação de achados; plausibilidade biológica; consideração de explicações alternativas; cessação da exposição; especificidade da associação; e consistência com outros conhecimentos (HILL et al., 2014).

Para que um alimento seja considerado probiótico, a legislação brasileira, a ANVISA estabelece que a quantidade mínima de microrganismos probióticos viáveis no alimento deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia (BRASIL, 2015).

A cepa probiótica selecionada deve, além de ser segura para o consumo humano, ser capaz de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal, ou seja, resistir ao ambiente ácido encontrado no estômago e aos altos níveis de sais biliares encontrados no intestino (DUNCAN; FLINT, 2013). Os micro-organismos *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* foram retirados da lista tendo em vista que além de serem espécies necessárias para produção de iogurte, não possuem efeito probiótico cientificamente comprovado.

Um dos problemas na determinação do perfil de segurança dos probióticos é que esses agentes na maioria das vezes são agrupados como um entidade única, quando eles devem ser

considerados em uma base de duplicação por tensão (SHANAHAN, et al., 2014, GHOSHAL, et al., 2017).

Há também dados publicados que abordam especificamente a segurança de probióticos individuais. Portanto, são necessários mais dados que examinem a segurança a longo prazo de cada tensão probiótica individual, incluindo o seu potencial como reservatório de genes de resistência a antibióticos. (SANDERS et al., 2010, GHOSHAL, et al., 2017).

Após uma longa história de uso seguro de probióticos em produtos lácteos fermentados e um maior reconhecimento de seus efeitos benéficos sobre a saúde humana, a indústria alimentícia tornou-se cada vez mais interessada nesses tipos de micro-organismos. Para uma boa parte dos pesquisadores, a seleção e a definição de um bom probiótico está relacionada com sua tolerância às condições gastrointestinais (ácido gástrico e bile), capacidade de aderir à mucosa gastrointestinal e exclusão competitiva de patógenos. Os mecanismos subjacentes aos efeitos benéficos dos probióticos são em grande parte desconhecidos, mas provavelmente são multifuncionais. Vários mecanismos relacionados aos efeitos antagônicos dos probióticos em vários micro-organismos incluem os seguintes mecanismos: secreção de substâncias antimicrobianas, adesão competitiva à mucosa e epitélio, fortalecimento da barreira epitelial intestinal e modulação do sistema imunológico (BERMUDEZ-BRITO et al., 2012, LUCHESE, 2012, GOUDARZI et al., 2014) A figura 04 representa os principais mecanismos de ação dos probióticos. Na figura seguinte é apresentado os principais órgãos /sistemas alvo para os quais as espécies de *Lactobacillus* têm efeito benéfico, sendo que esse efeito apresenta grande maioria para evitar as doenças do trato gastrointestinal e alergias.

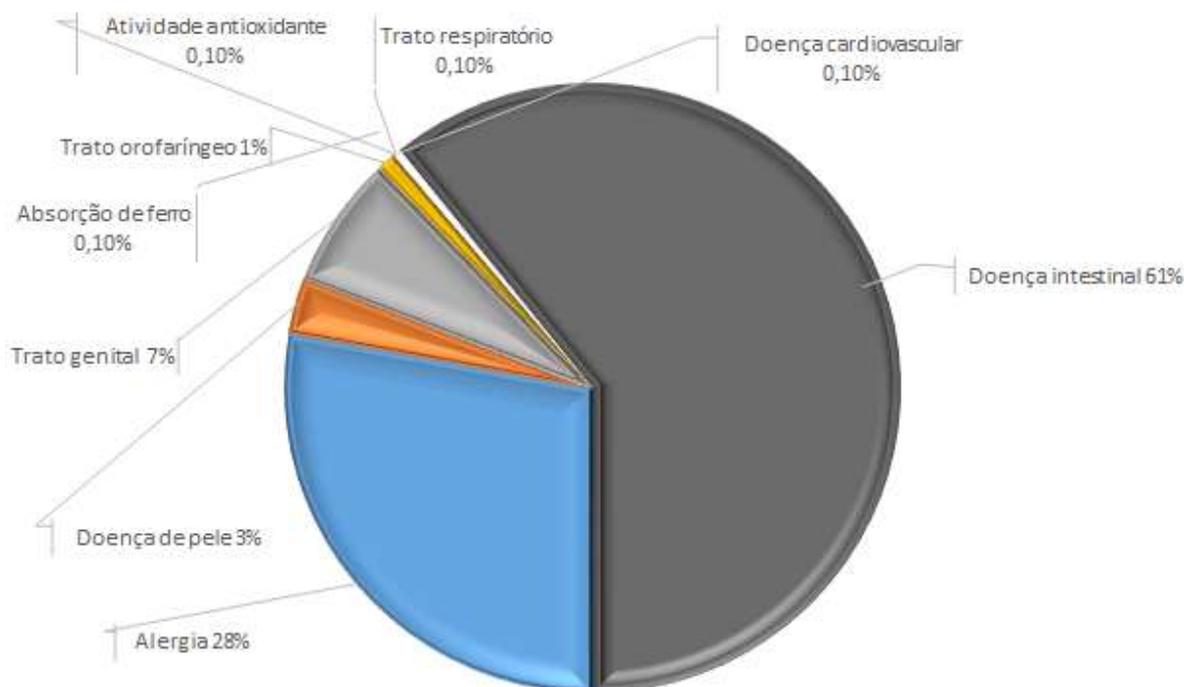


Figura 05. Órgãos/sistemas alvo para os quais as espécies de *Lactobacillus* têm efeito benéfico. Fonte: (SALVETTI e O'TOOLE, 2017).

A maioria das espécies de *Lactobacillus* tem uma longa história como uso seguro em produtos industriais e aplicações agrícolas. Além disso, estão entre os micro-organismos dominantes em comunidades microbianas de alimentos tradicionais fermentados e são parte de culturas iniciais naturais. Apesar de estar ocasionalmente envolvido em doenças humanas (como bacteremia e / ou septicemia sistêmica em pacientes já imuno comprometidos), o consumo diário de grandes quantidades de lactobacilos em um variedade de alimentos fermentados por pessoas de todas as idades e estados de saúde aparentemente não têm efeitos colaterais e geralmente foram considerados não patogênicos (EFSA, 2007).

As principais espécies usadas como probióticos estão resumidas na Tabela 04.

Tabela 04. Espécies mais utilizadas de bactérias lácticas em preparações de probióticos.

<i>Lactobacillu ssp.</i>	<i>Bifidobacterium sp.</i>	<i>Enterococcu ssp.</i>	<i>Streptococcu ssp.</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Ent. faecalis</i>	<i>S. cremonis</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Ent. faecium</i>	<i>S. diacetylactis</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. animalis</i>		<i>S. intermedius</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. infantis</i>		
<i>L. fermentum</i>	<i>B. themophilum</i>		
<i>L. lactis</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. brevis</i>			

Fonte: (HOLZAPFEL et al.; 2001; PARVEZ et al., 2006, GOUDARZI et al., 2014)

Além disso, há algumas preocupações sobre a segurança dos probióticos, uma vez que muitas das cepas utilizadas pertencem a alguns gêneros como, por exemplo, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Bacillus*, que contém muitas espécies patogênicas. (GOUDARZI et al., 2014).

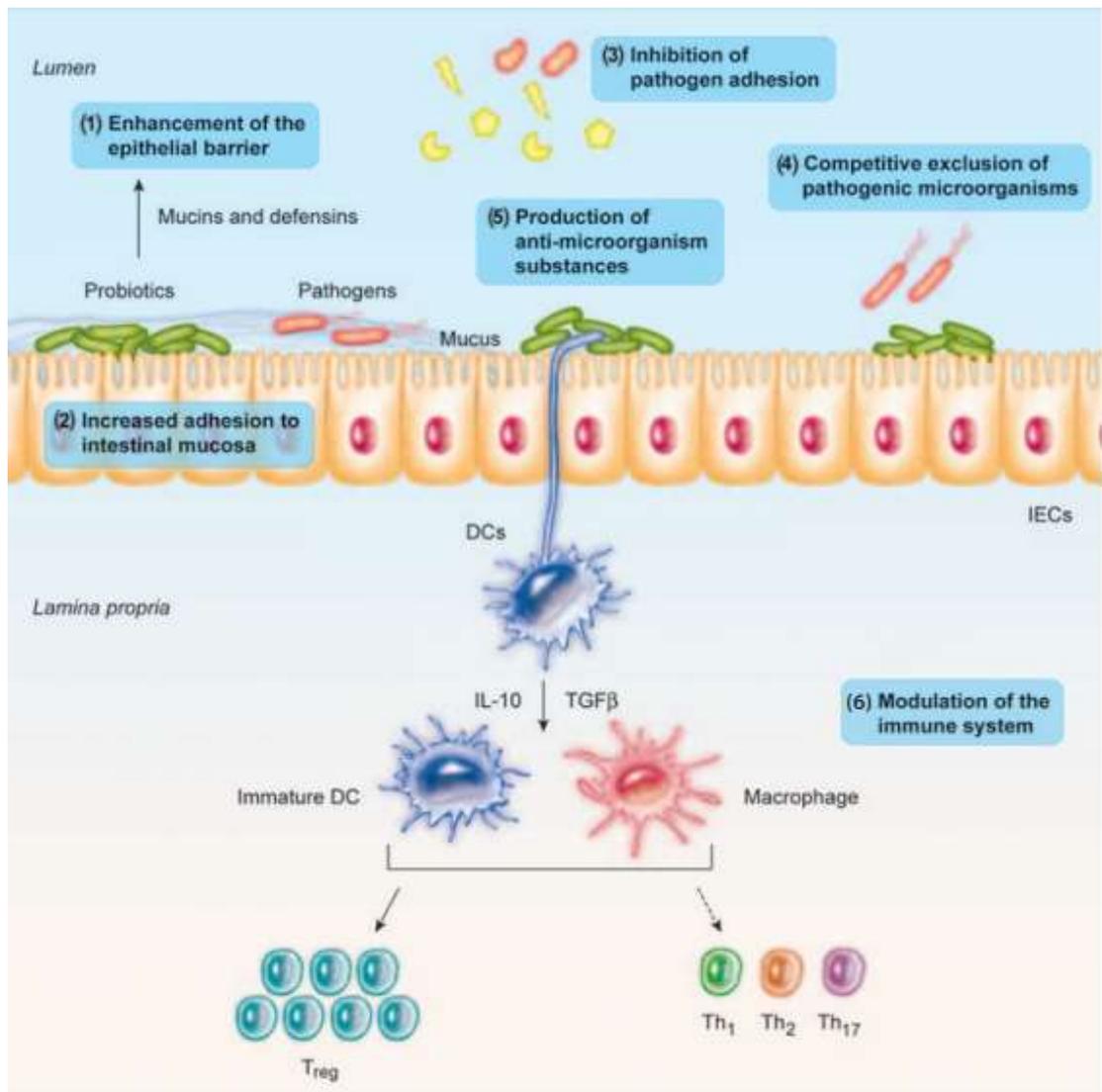


Figura 06. Principais mecanismos de ação dos probióticos. Fonte: (BERMUDEZ-BRITO et al., 2012).

Dentre os efeitos benéficos, os probióticos afetam as bactérias intestinais estimulando o aumento do número de bactérias anaeróbias benéficas e inibindo a população de microorganismos potencialmente patogênicos. Os probióticos afetam o ecossistema intestinal estimulando os mecanismos imunes da mucosa e os não-imunes através de um antagonismo e concorrência com os patogênicos potenciais. Pensa-se que esses fenômenos conduzem a efeitos benéficos, inclusive a redução da incidência e gravidade da diarreia, a patologia que mais se beneficia do uso de probióticos. Os probióticos reduzem o risco de câncer de cólon em modelos animais, provavelmente por sua capacidade de suprimir a atividade de certas enzimas bacterianas que podem aumentar os níveis de pró-carcinógenos, mas isto não foi provado em humanos. Estudos clínicos aleatorizados bem desenhados são necessários ainda para definir o papel dos probióticos como agentes terapêuticos na doença intestinal inflamatória (GUARNER et al., 2011).

Tabela 05. Mecanismos de interação probióticos/hospedeiro. A simbiose entre a flora e o hospedeiro pode ser otimizada por meio de intervenções farmacológicas ou nutricionais no ecossistema microbiano intestinal utilizando probióticos.

Probióticos	3
Benefícios imunológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Ativar os macrófagos locais para aumentar a apresentação dos antígenos para os linfócitos B e aumentar a produção de imunoglobulina A secretória (IgA) tanto local quanto sistemicamente; • Modular os perfis das citoquinas; • Induzir a hipo-resposta aos antígenos alimentares.
Benefícios não imunológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Digerir os alimentos e concorrer com os patógenos pelos nutrientes; • Alterar o pH local para criar um ambiente local desfavorável aos patógenos; • Produzir bacteriocinas para inibir os patógenos; • Fagocitar os radicais superóxidos; • Estimular a produção epitelial de mucina; • Aumentar a função da barreira intestinal; • Concorrer por aderência com os patógenos; • Modificar as toxinas de origem patogênica.

Fonte: Adaptado de GUARNER et al., 2011.

Os probióticos também podem melhorar, dentro dos limites fisiológicos, algumas funções do sistema digestivo, como frequência de fezes ou características subjetivas. O consumo de probióticos também pode ser útil na redução do risco de doenças específicas, atenuando sintomas objetivos e subjetivos. Experimentalmente, deve notar-se que os efeitos dos probióticos são observados principalmente pelo estudo de grupos de indivíduos doentes afetados. Esta escolha baseia-se em razões puramente metodológicas: não é fácil registrar efeitos positivos significativos de probióticos na ausência de anormalidades funcionais, como no caso de populações saudáveis (AURELI et al., 20011). Na tabela 06 é citado algumas vantagens do uso dos probióticos.

Tabela 06. Vantagens do uso de probióticos:

-
- Ajuda a manter o crescimento e a regeneração de células normais;
 - Mantem a regularidade e a consistência normal das fezes saudáveis;
 - Mantem o pH intestinal controlado;
 - Produz vitaminas tipo K e B;
 - Manter a função intestinal normal, o tom e a condição;
 - Produz enzimas que ajudam na digestão da lactose;
 - Aumenta a absorção de minerais e melhora a digestão de derivados do leite;
 - Melhorar o sistema imunológico através da produção de antimicrobianos, substâncias que eliminam várias bactérias maléficas;
 - Aumenta a absorção de cálcio, importante na prevenção de osteoporose;
 - Auxilia em uma função saudável do fígado;
 - Preveni infecções do trato gastrointestinal causadas por *Candida* e *Helicobacter pylori* (presente em condições de úlcera do estômago);
 - Ajuda no gerenciamento do colesterol (redução do soro colesterol) e também nos protege contra bactérias nocivas, fungos e vírus;
 - Atuam como fatores anti-carcinogênicos, com poderosos potenciais antitumorais;
 - Atuam como "cães de guarda", observando, controlando e efetivando a disseminação de micro-organismos indesejáveis;
 - Agem para aliviar os sintomas de ansiedade.

4.1.1

Fonte: (SHINDE, 2012)

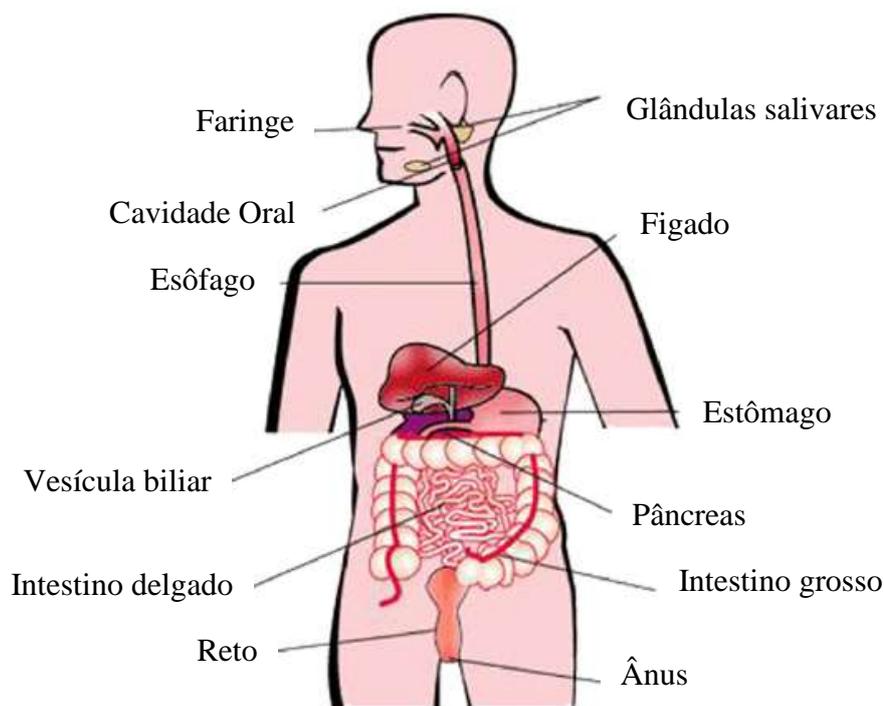


Figura 07. Anatomia do trato gastrointestinal. Fonte: Adaptado de (IANNITTI, PALMIERI, 2010)

Tabela 07. Componentes da flora do trato gastrointestinal.

Cavidade Oral (saliva)	<i>Streptococcus, Veillonella, Lactobacillus, Bifidobacterium, Fusobacterium, Staphylococcus, Bacteróides, Corynebacterium, Neisseria, leveduras.</i>
Estômago	<i>Streptococcus, Lactobacillus, Bifidobacterium, Bacteróides, Enterobacteriaceae, leveduras.</i>
Duodeno	<i>Streptococcus, Lactobacillus, Veillonella, Bacteróides Bifidobacterium, Enterobacteriaceae, leveduras.</i>
Íleo	<i>Streptococcus, Lactobacillus, Bifidobacterium Bacteróides, Clostridium, Enterobacteriaceae e leveduras.</i>
Colón	<i>Bacteróides, Eubacterium, ruminococcus, Coprococcus, Peptostreptococcus, Bifidobacterium, Streptococcus, Enterobacteriaceae, Lactobacillus e Clostridium.</i>
Fezes	<i>Bacteróides, Eubacterium, ruminococcus, Coprococcus, Peptostreptococcus, Bifidobacterium, Streptococcus, Enterobacteriaceae, Clostridium, Lactobacillus, Veillonella e leveduras</i>

Fonte: (IANNITTI, PALMIERI, 2010)

2.8 - Probióticos Psicobióticos

Psicobióticos são definidos como um organismo vivo que, quando ingerido em quantidades adequadas, produz um benefício para a saúde em pacientes que sofrem de doenças psiquiátricas. Como uma classe de probióticos, essas bactérias são capazes de produzir e/ou modular substâncias neuroativas, como ácido gamma-aminobutírico (GABA) e serotonina (5-HT), que atuam no eixo cérebro-intestino. Segundo Lyte (2011), existem provas que sugerem que a conexão entre a microbiota intestinal e o sistema nervoso, sendo que estudos em camundongos, por exemplo, mostraram que a presença de neuroquímicos, como serotonina, na corrente sanguínea era devido à absorção direta do intestino.

A avaliação pré-clínica em roedores sugere que certos psicobióticos possuem atividade antidepressiva e/ou ansiolítica. Os efeitos podem ser mediados através do nervo vago, da medula espinhal ou dos sistemas neuroendócrinos. Até agora, os psicobióticos foram estudados de forma mais abrangente em um ambiente psiquiátrico de ligação em pacientes com síndrome do intestino irritável, onde foram notificados benefícios positivos para vários organismos, incluindo *Bifidobacterium infantis*. A evidência está emergindo de benefícios no alívio de sintomas de depressão e síndrome de fadiga crônica. Tais benefícios podem estar relacionados às ações antiinflamatórias de certos psicobióticos e uma capacidade para reduzir a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (DINAN, STANTON E CRYAN, 2013).

Bravo et al, (2011), em seu experimento em camundongos utilizando o probiótico *L. rhamnosus* verificou que bactérias não patogênicas podem modular o sistema GABAérgico em camundongos e, portanto, podem ter efeitos benéficos no tratamento da depressão e ansiedade. O tratamento com *L. rhamnosus* induziu alterações na expressão da subunidade $\beta 1$ do receptor GABA A dependentes da região do cérebro, sendo observado aumento nas regiões corticais (cingulado e pré-límbico) e reduções concomitantes no hipocampo, amígdala e *locuscoeruleus*. De maneira semelhante. Bravo também percebeu que houve redução na expressão da subunidade $\alpha 2$ do mesmo receptor no córtex pré-frontal e amígdala, além de aumento no hipocampo. Nesse mesmo trabalho, foi verificado que o tratamento com probiótico *L. rhamnosus* reduziu o corticosterona induzida pelo estresse e comportamento relacionado à ansiedade e à depressão. (BRAVO et al, 2011).

Outros efeitos psicobióticos estão relacionados na Tabela 08.

Tabela 08. Estudos de avaliação da suplementação de probióticos em distúrbios do sistema nervoso central.

Referências	Coorte população	Probiótico	Resultados
Messaoudiet al., (2011)	55 voluntários humanos saudáveis mais 25 indivíduos com níveis de cortisol livre de urina (UFC) inferiores a 50 ng/mL (menos sujeitos estressados), 10 indivíduos receberam o probiótico e 15 placebo.	<i>Lactobacillus helveticus</i> R0052 e <i>Bifidobacterium longum</i> R0175 (PF)	Efeitos benéficos na ansiedade e depressão comportamentos relacionados em voluntários humanos saudáveis e voluntários com níveis mais baixos de cortisol
Bentonet al., (2007)	124 voluntários adultos saudáveis foram alocados aleatoriamente para um grupo que consumia, diariamente, uma bebida com leite contendo probiótico ou um placebo	<i>Lactobacillu scasei</i> Shirota	O consumo de um iogurte contendo probióticos melhorou o humor daqueles cujo humor era inicialmente pobre. No entanto, não houve uma maior frequência de defecação.
Steenbergenet al., (2015)	40 jovens jovens saudáveis foram aleatoriamente designados para receber uma intervenção de 4 semanas de probióticos de placebo ou multiespécies em um projeto de avaliação de intervenção triplo-cego.	<i>Bifidobacterium bifidum</i> W23, <i>Bifidobacterium lactis</i> W52, <i>Lactobacillus acidophilus</i> W37, <i>Lactobacillus brevis</i> W63, <i>Lactobacillus casei</i> W56, <i>Lactobacillus salivarius</i> W24 e <i>Lactococcus lactis</i> (W19 e W58)	Os participantes que receberam probióticos multiespécies mostraram uma reatividade cognitiva global significativamente reduzida ao humor triste, o que foi em grande parte explicado por ruminação reduzida e pensamentos agressivos.
Akkashehet al., (2016)	40 pacientes com diagnóstico de transtorno depressivo maior (MDD) cuja idade variou entre 20 e 55 anos foram randomizados.	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> e <i>Bifidobacterium bifidum</i> .	Os pacientes que receberam suplementos probióticos diminuíram significativamente as pontuações totais de Beck Depression Inventory
Marcos et al., (2004)	136 estudantes universitários foram randomizados.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> sub sp. <i>Bulgaricus</i> e <i>Streptococcus salivarius</i> sub sp. <i>Termófilo</i> mais <i>Lactobacillus casei</i> DN-114001	Não houve efeito significativo no tratamento da ansiedade.
Romijnet al., (2017)	79 participantes que atualmente não tomam medicamentos psicotrópicos com pontuações pelo menos moderadas em medidas de humor de auto-relato. Os participantes foram alocados aleatoriamente para receber uma preparação probiótica ou placebo.	<i>Lactobacillus helveticus</i> e <i>Bifidobacterium longum</i>	Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos probiótico e placebo em qualquer resultado psicológico medido.

Fonte: Adaptado de: (CERDÓ et al., 2017).

Apesar da maioria dos estudos encontrar resultados positivos nos sintomas nestes distúrbios neurológicos, estudos futuros são necessários para identificar potenciais probióticos para a modulação efetiva desses distúrbios, bem como para definir o risco probiótico em intervenções terapêuticas.

2.8.1 - Principais grupos de micro-organismos probióticos

Nas décadas recentes, os cientistas forneceram provas encorajadoras de que os micro-organismos probióticos são valiosos na prevenção e no tratamento de uma variedade de doenças. O uso de probióticos está se expandindo dramaticamente devido à nossa compreensão crescente de como esses micro-organismos benéficos exercem seus efeitos e quais tensões são efetivas para condições específicas (VILLENA e KITAZAWA, 2017).

Os microrganismos utilizados como probióticos em humanos e animais, são usualmente componentes não-patogênicos da microbiota normal, tais como as bactérias ácido-Láticas (principais gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Enterococcus*) e leveduras como *Saccharomyces boulardii* (FERREIRA et al., 2011).

As bifidobactérias são micro-organismos não formadores de esporos gram positivos. Este gênero inclui 30 espécies, 10 das quais são de origem humana (cáries dentárias, fezes e vagina), 17 de origem animal, 2 de águas residuais e 1 de leite fermentado. Tem como característica produzir ácido acético e lático na proporção de 3:2, a partir de dois moles de hexose, sem produção de CO₂. A enzima essencial desta via metabólica fermentativa é a frutose-6-fosfato fosfoetolase. Além da glicose, todas as bifidobactérias de origem humana são capazes de utilizar a galactose, a lactose e a frutose como fontes de carbono (CARVALHO et al., 2017)

Os *lactobacilos* constituem 43% (84 espécies) do número total de micro-organismos com uso benéfico certificado (195 espécies que representam 28 gêneros de Phyla Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria), sendo 22 deles representados por cepas que são patenteadas na Europa devido às suas potenciais propriedades probióticas (BOURDICHON et al., 2012, SALVETTI e O'TOOLE, 2017).

Do ponto de vista regulatório, o gênero *Lactobacillus* inclui trinta e seis (36) espécies que receberam o status de Presunção Qualificada de Segurança (PQS), são: *Lactobacillus* (*acidophilus*, *amyolyticus*, *amylovorus*, *alimentarius*, *aviaries*, *brevis*, *buchneri*, *casei*, *cellobiosus*, *coryniformis*, *crispatus*, *curvatus*, *delbrueckii*, *diolivorans*, *Farciminis*, *fermentum*, *gallinarum*, *Gasseri*, *helveticus*, *hilgardii*, *johnsonii*, *kefirnofaciens*, *kefiri*, *mucosae*, *panis*, *colinoides*, *paracasei*, *paraplantarum*, *pentosus*, *plantarum*, *pontis*, *reuteri*, *rhamnosus*, *sakei*, *salivarius*, *sanfranciscensis*) pela EFSA (EFSA, 2016, SALVETTI e O'TOOLE, 2017) e doze (12) espécies são Geralmente Reconhecidas como Seguras (GRAS) pela US Food and Drug Administration (FDA), são: *Lactobacillus* (*acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. sakei*), (SALVETTI e O'TOOLE, 2017).

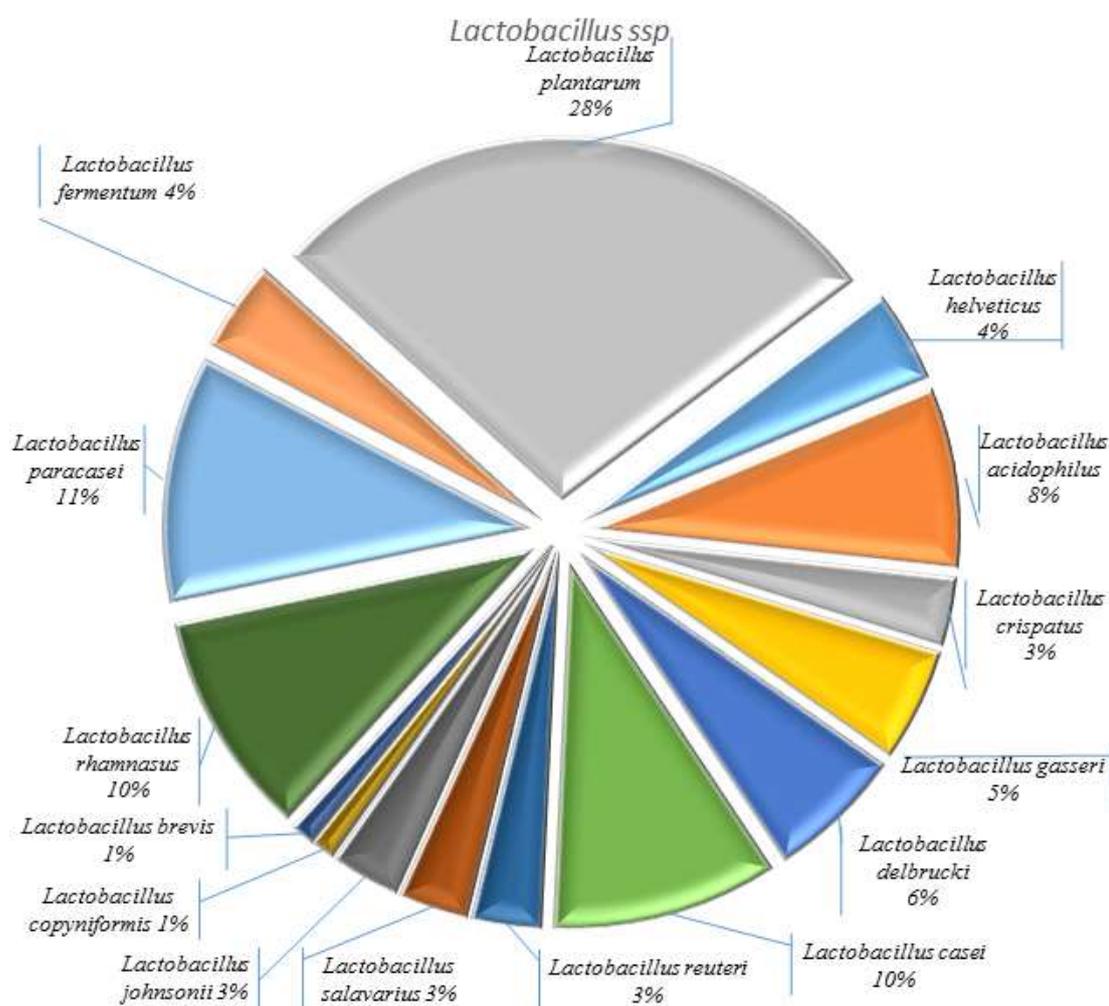


Figura 08. Espécies de *Lactobacillus* utilizadas em aplicações benéficas para a saúde. Fonte: (SALVETTI e O'TOOLE, 2017).

Com relação à atividade psicobiótica dos probióticos, Lyle (2011) lista vários neurotransmissores (normalmente produzidos pelo cérebro) que também são produzidos por vários probióticos no intestino: noraepinefrina por espécies de *Sacharomyces*, serotonina por *Streptococcus* e *Enterococcus*, GABA por *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, noraepinefrina e dopamina por *Bacillus* e acetilcolina por *Lactobacillus*.

De outra forma, neurotransmissores podem ser modulados pela microbiota intestinal. Cepas de *Lactobacillus acidophilus* induziram a expressão de receptores opióides e canabinóides nas células epiteliais intestinais (ROUSSEAU et al., 2007). Além disso, *Bif. infantis* aumenta os níveis plasmáticos de triptofano e, assim, modula 5-HT (DINAN e CRYAN, 2017). Por sua vez, *Lactobacillus rhamnosus* altera a expressão do receptor para GABA (BRAVO et al., 2011).

2.8.2 Propriedade biológicas e alegações de saúde

No Brasil a Resolução-RDC ANVISA Nº 2, DE 7 de janeiro DE 2002, é que padroniza os procedimentos a serem adotados para a avaliação de segurança, registro e

comercialização de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde.

À medida que o conhecimento sobre o microbioma na saúde e doença se expandiu, também houve grande interesse na manipulação terapêutica do microbioma. Uma dessas abordagens é o uso de probióticos. As propriedades biológicas de uma série de organismos probióticos putativos são amplamente estudadas “in vitro” e em modelos animais e vários efeitos impactaram potencialmente em doenças humanas identificadas (GHOSHAL, et al., 2017).

Os probióticos estão disponíveis em diversos formatos: como organismos únicos, como um coquetel de organismos múltiplos, ou em combinação com um prebiótico (simbiótica). Embora, sem dúvida, exerça importantes efeitos biológicos e clínicos, os probióticos possuem registro de segurança excelente e de longa data, mas não são inteiramente sem risco. (ROWLAND, et al., 2010, SANDERS et al., 2010, GHOSHAL, et al., 2017).

2.8.3 - Uso de probióticos durante a prenhez e a lactação

A prenhez e a lactação são estágios críticos para a microbiota intestinal. Nessas etapas, a microbiota da prole é modificável, oferecendo janelas de oportunidades para a administração de probióticos como estratégia para apoiar o estabelecimento compatível com a saúde. Os probióticos administrados durante a prenhez e a lactação utilizando modelos animais, tem o objetivo de conciliar os mecanismos moleculares que podem ser responsáveis pelos benefícios observados nos seres humanos. Especificamente, o foco é a propensão dos probióticos administrados no início da vida para manter uma composição de microbiota intestinal eubiótica, garantir maturação intestinal adequada, prevenir infecções patogênicas e melhorar as respostas imunológicas (HASHEMI, et al., 2016).

Durante a prenhez, a microbiota intestinal sofre várias alterações de composição. Do primeiro ao terceiro trimestre, a microbiota da mãe é remodelada de uma comunidade rica e diversificada para uma menor diversidade caracterizada por um aumento geral de Proteobactérias e Actinobactérias (KOREN, et al., 2012). No entanto, acredita-se que o feto fosse estéril com o desenvolvimento da carga microbiana para ser estritamente um processo pós-natal determinado por transmissões verticais, *através* da mãe e horizontal *através* do meio ambiente (HASHEMI, et al., 2016). No entanto, na última década tem fornecido evidências que sugerem que os mecanismos pré-natais podem iniciar mudanças de composição na microbiota mais cedo do que se acreditava anteriormente. Isso se deve ao fato de que há detecção de microorganismos na placenta (AAGAARD et al., 2014), cordão umbilical, (JIMÉNEZ et al., 2005), líquidos amnióticos e membranas fetais de recém nascidos saudáveis, (RAUTAVA et al., 2012) sem indicação de infecção patogênica.

Alguns estudos afirmam que a mãe é de suma importância para determinar a microbiota intestinal da prole durante a prenhez. O mecanismo pelo qual as bactérias intestinais da mãe entram no ambiente uterino não está bem elucidado, no entanto, as células dendríticas podem manipular junções ocludentes dentro do epitélio intestinal, permitindo a translocação de micro-organismos do lúmen intestinal (RESCIGNO, et al., 2001). Este transporte fagocítico permite que as bactérias viajem para a placenta *através* da corrente sanguínea (FUNKHOUSER e BORDENSTEIN, 2013) Curiosamente, mostrou-se que a translocação bacteriana do intestino para os gânglios linfáticos mesentéricos e a glândula mamária é aumentada durante o atraso da prenhez e ao longo do período de lactação em camundongos (PEREZ et al., 2007). Há evidências de que os probióticos administrados a mulheres grávidas podem ser recuperados no trato intestinal de a sua prole e influenciam a composição microbiana intestinal da criança (THUM et al., 2012).

Especificamente, o consumo de *Lactobacillus rhamnosus* GG durante situações atraso na prenhez resultou na colonização de bebês até 24 meses de idade e também aumentou a diversidade de bifidobactérias (GUEIMONDE et al., 2006). Além disso, a administração de *L. rhamnosus* GR-1, juntamente com uma fonte vegetal de micronutrientes, durante o segundo e terceiro trimestres de gestação, resultou em maior diversidade microbiana vaginal em mulheres da Tanzânia, juntamente com uma maior abundância de *Bifidobacterium* e diminuição da abundância de *Enterobacteriaceae* nas fezes do recém-nascido (BISANZ et al., 2015).

O processo de estabelecimento pós-natal da microbiota intestinal tem sido bem caracterizado. O nascimento é a primeira oportunidade para a exposição microbiana fora do útero e a identidade dos micróbios que inoculam a criança nesta fase é fortemente dependente do modo de parto. A microbiota dos bebês de parto normal é semelhante à microbiota vaginal da mãe (*Lactobacillus*, *Prevotella*, *Sneathia* spp.), (DOMINGUEZ-BELLO et al., 2010), enquanto a microbiota daquelas que nasceram a partir de cesariana apresentam diminuição de riqueza e diversidade, (AZAD et al., 2013), além de ser mais parecida com o da superfície da pele da mãe (*Staphylococcus*, *Corynebacterium* *Propionibacterium* spp), (DOMINGUEZ-BELLO et al., 2010). Os primeiros microorganismos colonizadores do microbioma infantil após o nascimento são bactérias anaeróbicas aerotolerantes e facultativas. Isto é mostrado aos 3 dias de idade em fezes infantis, onde há uma carga relativamente alta de Lactobacillales, refletindo a microbiota vaginal, bem como a *Escherichia* das Enterobacteriales (AVERSHINA et al., 2014).

As atividades metabólicas dessas bactérias reduzem a concentração local de oxigênio e criam um ambiente mais habitável para posterior colonização por anaeróbios rígidos, como *Bifidobacterium* spp, *Clostridium* e *Bacteroides* (SCHAEGLER et al., 1965, DAVIS et al., 1973). Esse fato é mais facilmente constatado com 10 dias de vida e aos 4 meses de vida, quando há uma diminuição significativa em anaeróbios facultativos (*Escherichia*) e um aumento de bactérias anaeróbicas (predominantemente *Bifidobacterium*), (AVERSHINA et al., 2014).

As condições nutricionais, a resposta imune e o modo de parto interagem coletivamente uns com os outros e, por sua vez, influenciam na microbiota intestinal. O feto entra em contato com micro-organismos oriundos do intestino materno através da placenta e do líquido amniótico. Um inóculo maciço de bactérias maternas é encontrado durante o parto normal, que também está associado ao aumento da permeabilidade intestinal materna e translocação de bactérias intestinais para o leite materno. A amamentação não só modula a colonização bacteriana neonatal e a maturação imune, mas é uma fonte direta de bactérias maternas. Após o nascimento, o contato pele a pele com a mãe garante a transferência direta de bactérias maternas para o bebê para melhorar a maturação imune e metabólica saudável (RAUTAVA et al., 2012).

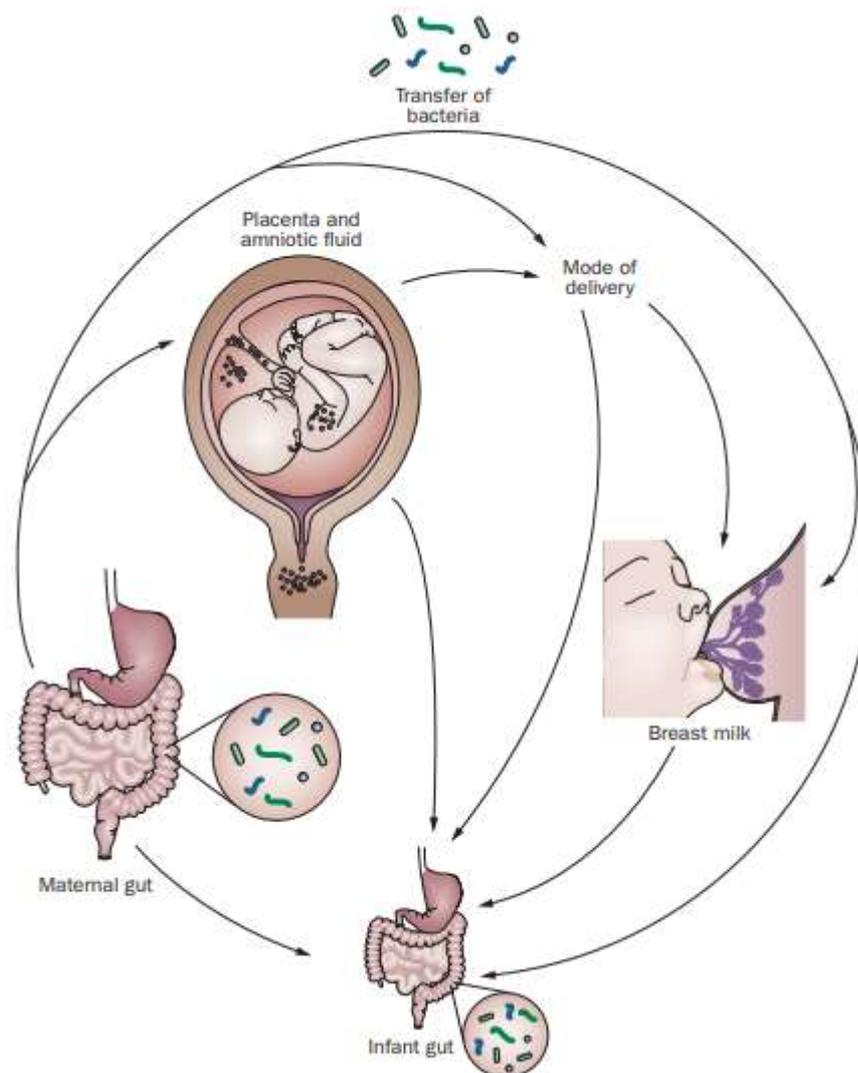


Figura 09: Os programas de microbiota intestinal auxiliam na saúde da mãe e do bebê. Fonte: (RAUTAVA et al., 2012).

O uso adequado de probióticos possui diversas evidências sobre a redução de doenças em seres humanos (KALLIOMÄKI et al. 2003, RAUTAVA et al., 2012). A suplementação probiótica perinatal é recomendada e pode influenciar a composição e atividade precoce da microbiota e seus efeitos clínicos de saúde de intervenção probiótico foram demonstrados para serem duradouros, consistente com a noção de programação microbiana perinatal. Pesquisas sugerem que os probióticos administrados na primeira infância podem aumentar a maturação imune saudável e reduzir o risco de eczema em crianças de alto risco. Com base em relatórios publicados, parece que a intervenção probiótica é mais efetiva se iniciada na fase pré-natal (NIERS et al. 2009, DOTTERUD et al., 2010, RAUTAVA et al., 2012).

Com a descoberta da importância do contato pré-natal microbiano com o desenvolvimento fetal e infantil abre novas e intrigantes possibilidades para o uso de probiótico através da mulher grávida. Estudos relatam que a suplementação materna com a combinação dos probióticos *L. rhamnosus* GG e *Bifidobacterium lactis* Bb12 do primeiro trimestre da gravidez até o final da amamentação reduz o risco de sensibilização atópica em lactentes de alto risco (SOH et al., 2009).

Surpreendentemente, foi observado uma redução estatisticamente significativa do diabetes mellitus gestacional em mulheres que receberam probióticos em comparação com as do placebo no mesmo estudo (HUURRE et al., 2008). Além disso, a suplementação de probióticos resultou em concentrações de glicose plasmática e sensibilidade a insulina consistentemente melhoradas, não apenas durante a prenhez, mas também 12 meses pós-parto entre mulheres metabolicamente saudáveis (LUOTO et al., 2010). O mesmo estudo forneceu evidências clínicas de que o consumo de probióticos reduz o risco de adiposidade central materna ao longo do período pós-parto de 6 meses (LAITINEN et al., 2008). A obesidade materna e a intolerância à glicose são fatores de risco conhecidos para o excesso de peso e a obesidade na prole e, de acordo com essa evidência, demonstramos que a intervenção probiótica perinatal modera o aumento excessivo de peso, especialmente entre as crianças que mais tarde ficaram acima do peso durante os primeiros anos de vida, o efeito sendo mais pronunciado aos 4 anos de idade (ILMONEN et al., 2011).

4 OBJETIVO

- Evidenciar o efeito da suplementação materna com probiótico (*Lactobacillus paracasei*) durante a prenhez e lactação, no desenvolvimento neurocomportamental da prole de camundongos swiss.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão de TPH2, 5-HT1a, BDNF, TRKB, TH, GAD 67, GAD 65, as subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 5$ em amostras do hipocampo pelo método de RT-PCR;
- Avaliar a atividade motora espontânea utilizando o teste do campo aberto;
- Avaliar a expressão de comportamento semelhante à ansiedade utilizando o teste do labirinto em cruz elevado e do teste da caixa claro;
- Avaliar a expressão de comportamento semelhante à depressão utilizando teste da suspensão pela cauda.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Doze camundongos fêmeas da linhagem Swiss Webster, com 60 dias de vida e peso aproximado de 30g, fornecidos pelo biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ, foram acasalados e divididos em dois grupos experimentais (n=6): controle e tratado. Os casais foram colocados em caixas de 30 x 19 x 13 cm (l x c x a) e mantidos em salas com ambiente aclimatizado (temperatura de 20°C ± 2°C e umidade a 60%) e com ciclo de claro-escuro 12h-12h. Durante esse período, os animais receberam água e ração (Purina®) *ad libitum*. Após a detecção da prenhez através do diagnóstico realizado a partir da visualização de espermatozoides no lavado vaginal, os casais foram separados e dá-se início ao experimento. As fêmeas do grupo controle receberam apenas leite e as do outro grupo, leite inoculado com probiótico.

4.2 Microrganismo

Foi utilizado *Lactobacillus paracasei* DTA 83 isolado em agar de Lamvab (HARTEMINK et al., 1997) a partir de amostra fecal de lactente de até duas semanas de idade. Esta cepa foi identificada por amplificação e sequenciamento da região 16S do rDNA como descrito por (ANDRIGHETTO et al. 2001) e faz parte da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

A cultura de trabalho foi preparada por ativação da cultura de estoque congelada através de três subcultivos sucessivos em caldo MRS (Himedia, Mumbai, Índia) com incubação a 36°C. Na última subcultura, os tubos foram centrifugados a 6000g durante 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular lavado duas vezes antes de resuspender em tampão fosfato pH 7,2 e inocular esta suspensão em de leite desnatado reconstituído 12% (esterilizado a 110 ° C durante 10 minutos) de modo a conter cerca de 10⁷ UFC / mL.

4.3 Desenho experimental

Foram utilizados dois grupos (n = 6 cada pesando ~ 35g) camundongos (*Mus musculus*), fêmeas de linhagem Swiss. As fêmeas, foram tratados durante a prenhez e lactação com leite (grupo controle) ou leite inoculado com *L. paracasei* numa concentração de 10⁷ células/mL (grupo experimental). Ambos os grupos receberam 0.1 mL de solução diariamente por via oral através do método de gavagem. Os filhotes ao atingir o desmame (21 dias pós-natal), foram separados e parte dos filhotes, inclusive todas as fêmeas, foram submetidas à eutanásia para coleta do hipocampo, que foi usado para análise neurobiológica através da técnicas de RT-qPCR. Os camundongos machos após atingir 21 dias pós-natal (DPN), foram submetidos ao desmame, sendo realocada em caixas polipropileno de 34 x 40 x 20 cm com no máximo dez animais. Ao atingirem a fase adulta, mais especificamente 70 DPN (dias pós-natal), os filhotes foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais compostas pelos seguintes ensaios: teste do campo aberto, caixa claro-escuro, labirinto em cruz elevado, e suspensão pela cauda. Filhotes fêmeas não foram utilizadas nos testes comportamentais devido o ciclo estral influenciar no resultado dos testes, uma vez que nessa fase a fêmea libera grande quantidade de hormônios.

Com exceção dos filhotes de 21 DPN, todos os animais utilizados nos diferentes procedimentos metodológicos foram submetidos à eutanásia por sobrecarga anestésica. As carcaças foram armazenadas em freezer e posteriormente recolhidas por firmas especializadas para posterior cremação.

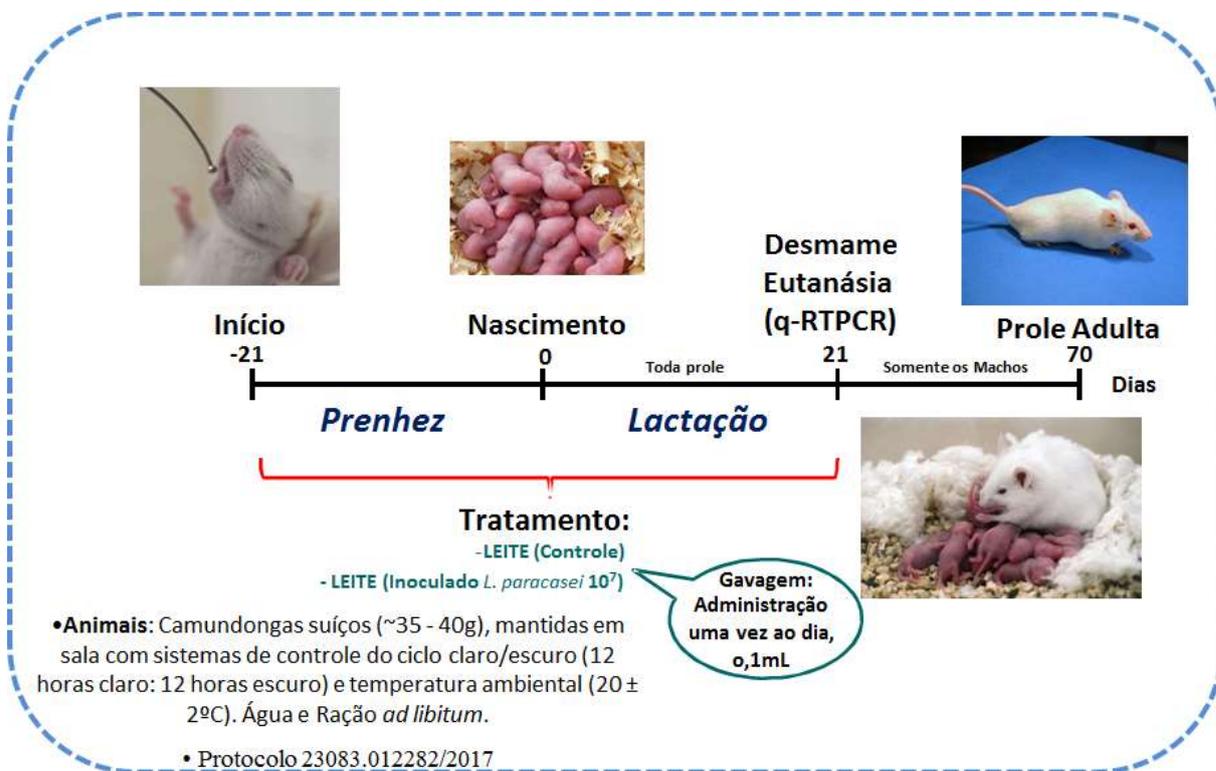


Figura 10: Desenho experimental da programação materna com probióticos.

4.4 Aspectos éticos

Todos os procedimentos utilizados nesse estudo estão de acordo com as normas e princípios éticos preconizados pela Comissão de Ética para Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (protocolo 23083.012282/2017), que segue a Lei 11.794 de 09 de outubro de 2008 que estabelece procedimentos para uso de animais em pesquisa e ensino, além do Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publicação N° 85-23, revisado 1996).

4.5 Procedimentos experimentais

4.5.1. qRT-PCR

Foi utilizada a técnica semi-quantitativa de RT-PCR para determinar os níveis de RNAm para as seguintes proteínas provenientes de amostras de hipocampo: TPH2, 5HT1a, BDNF, TRKB, TH, GAD 67, GAD 65, bem como as subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 5$.

A extração de RNA das amostras de hipocampo foi realizada através de um método padrão que utiliza 1ml de TRIZOL® (TRIZol Reagent; Life technologies, Invitrogen) para 50mg de tecido. O RNA total extraído foi armazenado em freezer à 20° C e, posteriormente,

submetido à análise quantitativa através da análise da concentração (em $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e da pureza estabelecidas pela utilização de um nano fotômetro. Não obstante, depois da quantificação do RNA total extraído, uma alíquota de cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 2% em TAE 1X (0,04 M Trisacetato + 1 mM EDTA) para a verificação da integridade das amostras

Para a síntese de fitas simples de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA total através do mecanismo de transcrição reversa, foi utilizado um kit da *Promega*, por meio do protocolo fornecido pelo fabricante. Em seguida, foi realizada a amplificação do fragmento correspondente ao RNAm do gene desejado, utilizando-se um aparelho de PCR *Mastercyclerep Realplex (Eppendorf, Germany)*, que possui um sistema de detecção e quantificação de fluorescência produzida durante os ciclos de amplificação. Nesse aparelho, as amostras foram desnaturadas pela incubação a 50°C durante 2 min e a 95°C por 10 minutos. Logo após, as reações foram 40 vezes repetidas ciclicamente, usando as seguintes etapas para todos os genes estudados: 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos (Machado et al, 2009). A fluorescência da reação de amplificação entre os primers e *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (Fermentas, USA)* foi detectada no fim de cada ciclo para monitorar a quantidade de produto de PCR formado. Para tanto, foi feita a padronização por meio da análise de diluições seriadas de cDNA para os diferentes genes estudados a fim de calcular a eficiência de cada ensaio.

Os níveis relativos de RNAm foram determinados pela comparação de uma linha limiar que foi traçada na curva exponencial, formada a partir da amplificação de DNA. Essa curva foi usada para calcular o CT (do inglês *cyclethreshold*) de cada amostra, ou seja, o ciclo do PCR no qual a fluorescência cruza a linha de base. O valor do CT é inversamente proporcional à quantidade de amostra na reação, assim quanto maior a concentração do DNA de estudo, menor é o valor de CT.

Após a normalização das amostras, o grupo controle teve seu valor convertido para 1 e os outro grupo teve seus valores convertidos em relação a ele conforme o método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Ademais, é importante ressaltar que cada amostra foi analisada em duplicata.

Os primers de interesse utilizados para a amplificação do DNA foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies Inc. Como controle interno dos experimentos foi utilizado o gene β -actina, um gene constitutivo. Na tabela 2, são destacados a sequência de oligonucleotídeos presentes nos primers utilizados para avaliação quantitativa dos diferentes genes estudados.

4.5.2. Avaliação psicobiológica

Em todos os testes, o número de animais utilizados foi de dez a doze indivíduos em cada grupo experimental.

Todos os testes foram realizados entre 7:00 e 10:00 horas. Durante cada teste, os experimentadores ficaram do lado de fora da sala de comportamento. No entanto, no intervalo entre os testes, os mesmos entravam na sala, retiravam os animais e higienizavam devidamente os aparatos com álcool 10%. Ademais, é importante salientar que todos os testes foram gravados e os parâmetros comportamentais foram analisados posteriormente por dois ou mais experientes pesquisadores.

4.5.2.1 Teste do campo aberto

Este teste é um simples protocolo, cuja avaliação dos seus componentes têm sido amplamente utilizada para determinação de emocionalidade (ROTH & KATZ, 1980) e da atividade locomotora espontânea e exploratória em roedores (WALSH & CUMMINS, 1976). Além disso, este teste também é considerado um excelente modelo sensível a drogas com propriedades ansiolíticas (PRUT & BELZUNG, 2003).

Imediatamente antes do ensaio, cada animal foi inserido individualmente no centro de uma caixa circular, de acrílico (30 cm de diâmetro) dividida em 12 quadrantes distribuídos em duas diferentes zonas (central e periférica), onde os mesmos foram permitidos a explorar o ambiente por 5 minutos (Figura 11). Nesse protocolo, foram avaliados número de quadrantes totais, número de quadrantes centrais, o número de rearings (levantamento das patas dianteiras pressionadas contra a parede da arena), tempo de grooming (autolimpeza), o tempo de permanência na zona central, razão central (relação entre número de quadrantes centrais e totais) e número de bolos fecais. No final do ensaio, o número de bolos fecais também foi avaliado. Nesse teste, a atividade locomotora/exploratória é indicado pela distância total percorrida e pelo número de rearings, enquanto o número de bolos fecais são utilizados para avaliar o grau de emocionalidade. Por fim, as respostas semelhantes à ansiedade estão ligadas ao tempo de permanência no centro e pela razão central (MCILWAIN et al., 2001).



Figura 11: Teste da campo aberto.

4.5.2.2 Teste da caixa claro-escuro

Esse teste é baseado na aversão inata dos roedores por locais fortemente iluminados e por ambientes novos (CRAWLEY & GOODWIN, 1980). Nesse protocolo, os animais foram alocados individualmente em uma caixa de acrílico (45cm x 27cm x 27cm) dividida de forma desigual em dois ambientes divididos por uma divisória dotada de uma pequena abertura, que permite a transição dos indivíduos no aparato. Dois terços da ambiente é fortemente iluminado (400 lux), enquanto a outra porção é escura (10 lux). Desse modo, os animais foram colocados no lado escuro, onde foram permitidos explorar o aparato por 5

minutos (Figura 12). Durante esse período, foram analisados o número de transições e o tempo de permanência no ambiente claro, bem como a latência de entrada no ambiente mais iluminado. Todos esses parâmetros são relacionados com o comportamento semelhante à ansiedade. Além disso, o comportamento de tomada de decisão e exploração foram avaliados pelo número de tentativas e pelo número de rearings, respectivamente.

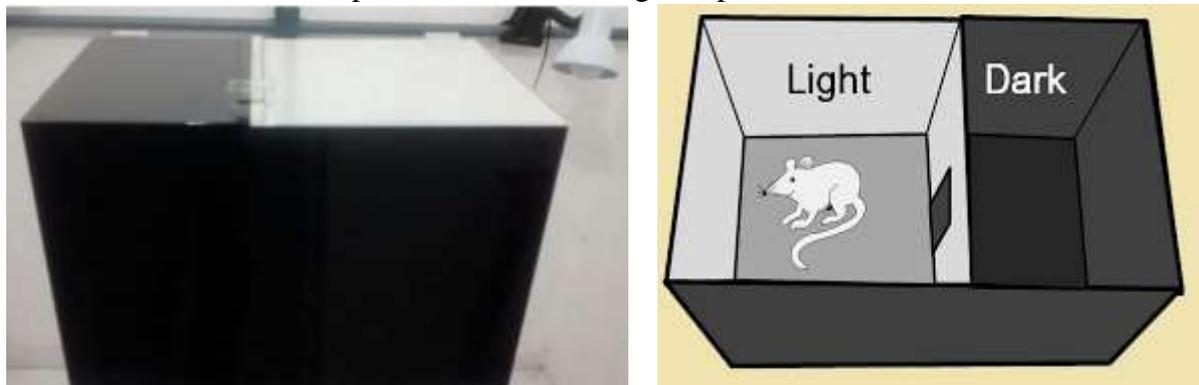


Figura 12a: Teste da caixa claro-escuro. **Figura 12b:** Teste da caixa claro-escuro.

4.5.2.3 Teste do labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado reflete um conflito entre a preferência dos roedores por áreas protegidas e sua motivação natural de explorar novos ambientes (PELLOW et al, 1985). Dessa forma, este teste presta-se à avaliação de aspectos relacionados à ansiedade e medo (ARCHER, 1973). Além disso, durante este teste é possível avaliar aspectos que envolvem a tomada de decisão dos animais, que está diretamente relacionada à análise de risco e, conseqüentemente, com o status de ansiedade (MIKICS et al, 2005).

O aparato utilizado no teste do labirinto em cruz elevado consiste em dois braços abertos (50 x 10 cm) cruzados por dois braços opostos fechados com as mesmas dimensões, situados a 40 cm de altura em uma sala com luz vermelha. Os braços são conectados por uma plataforma central (10 x 10 cm), cuja estrutura é semelhante a uma cruz grega. Desse modo, os camundongos foram inseridos individualmente na plataforma central da cruz com a cabeça voltada para um dos braços fechados, sendo permitida a exploração do aparato por 5 minutos (Figura 13).

Durante este período, foram registrados parâmetros relacionados ao comportamento semelhante à ansiedade tais como: o tempo cumulativo e a frequência de entradas nos braços abertos e fechados. No entanto, é importante frisar que somente foi contabilizado como entrada aquela tentativa em que os animais posicionavam todas as patas em um dos quatro braços. Após a avaliação dos parâmetros anteriores, a porcentagem de entradas nos braços abertos e o tempo de permanência na plataforma central foram calculados. Além disso, o comportamento de tomada de decisão foi avaliado pelo número de extensões das patas posteriores (SAP-Stretch attend postures).



Figura 13: Teste do labirinto em cruz elevado.

4.5.2.4 Teste da Suspensão pela Cauda

Este teste baseia-se na observação de que os roedores após a execução inicial de movimentos orientados de escape desenvolvem uma postura imóvel quando colocado numa situação estressante inevitável (PORSOLT et al., 1977). Nesse teste, a condição envolve o estresse hemodinâmico inescapável causado pelo fato dos animais estarem pendurados pela cauda. Para realização desse protocolo, os camundongos foram fixados em uma haste à 100 cm do chão com auxílio de uma fita adesiva (Figura 14). Durante o intervalo de 5 minutos, foram contabilizados os seguintes parâmetros: o tempo de imobilidade, a latência para o primeiro episódio de imobilidade. Sabe-se que a imobilidade pressupõe uma baixa capacidade de resiliência e, por conseguinte, um elevado status de comportamento semelhante à depressão (PORSOLT et al., 1977).

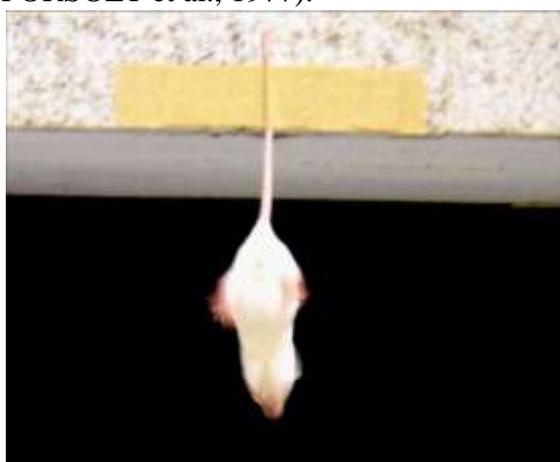


Figura 14: Teste da suspensão pela cauda.

4.5.2.5 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram apresentados em valores de média \pm erro padrão. A suposição da distribuição normal dos dados foi avaliada com o teste ShapiroWilk. Dessa forma, se os dados passassem no teste de normalidade, comparações paramétricas foram realizadas. Nesse caso, para grupos submetidos à interferência de apenas um fator de variação, os dados foram analisados por T Student. Caso necessário, foi usado o teste de Grubbs para detecção de valores aberrantes (Figura 15). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando os valores de $p < 0,05$. Vale destacar que o software GraphPadPrism 5 (La Jolla, CA, EUA) foi utilizado para todas as análises estatísticas.

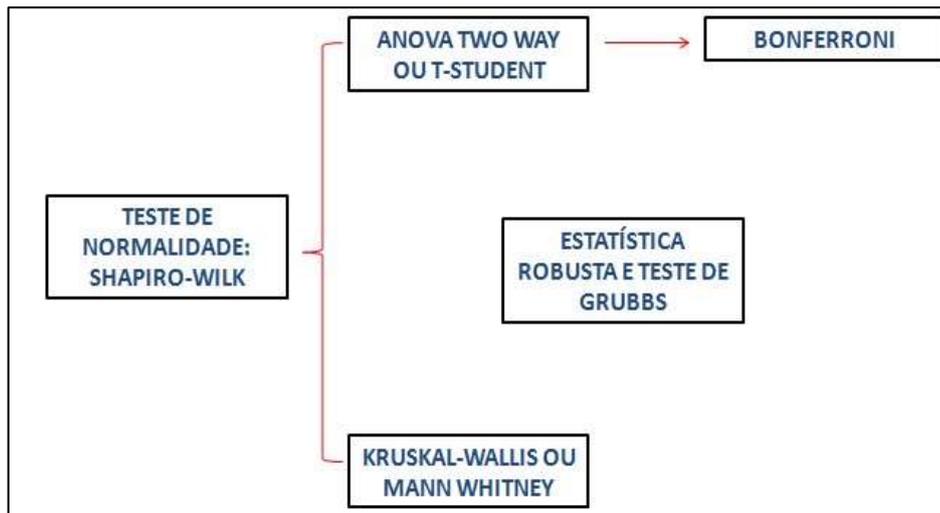


Figura 15. Representação esquemática dos procedimentos estatísticos adotados.

6 RESULTADOS

5.1 Expressão Gênica Hipocampal

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, foi verificado que suplementação materna com probiótico durante a prenhez e lactação causou redução significativa da expressão hipocampal dos genes que codificam as enzimas GAD65 ($0,81 \pm 0,101$ vs. $1,00 \pm 0,04$, $p = 0,006$) e GAD 67 ($0,75 \pm 0,05$ vs. $1,00 \pm 0,03$, $p = 0,001$), além da subunidade $\alpha 3$ do receptor GABA A ($0,38 \pm 0,01$ vs. $1,23 \pm 0,24$, $p = 0,009$) na prole com 24 DPN. Também foi observada uma tendência à infra-regulação da TH ($p = 0,07$). Não houve diferenças significativas na expressão de TPH2 ($p = 0,79$), do receptor 5HT1a ($p = 0,36$), BDNF ($p = 0,61$), bem como nas subunidades $\alpha 2$ ($p = 0,42$) e $\alpha 5$ ($p = 0,22$) do receptor GABA A (Figura 16 e 17).

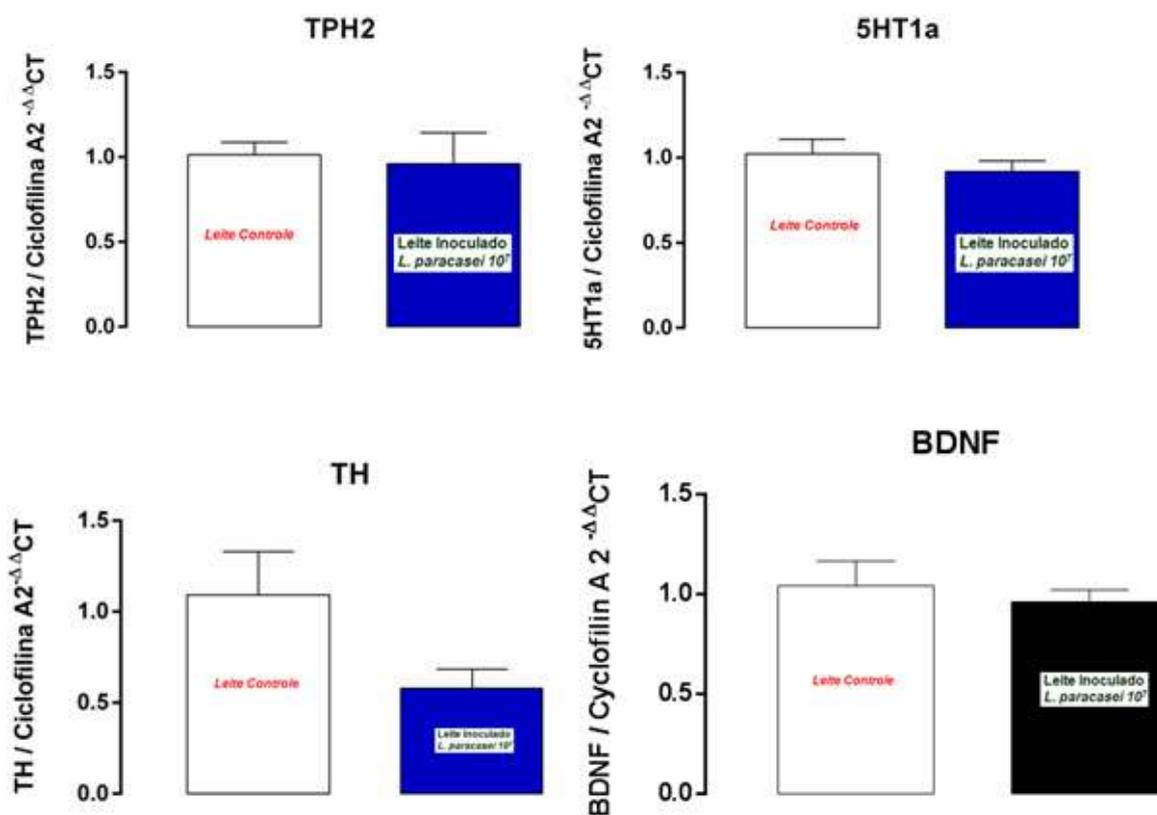


Figura 16: Expressão gênica hipocampal de TPH2, 5HT1a, TH, BDNF em camundongos com 21 DPN cujas mães foram tratadas com leite (controle) ou leite inoculado com *L. paracasei* (probiótico). Nessa avaliação, não foram verificadas diferenças significativas. N = 6.

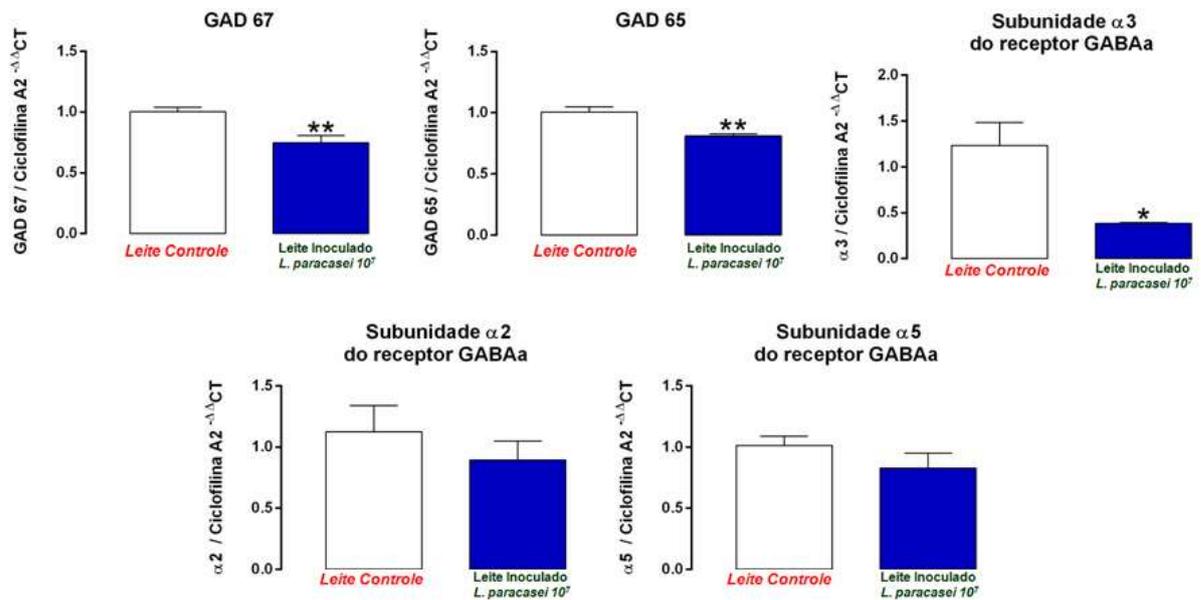


Figura 17: Expressão gênica hipocampal de GAD 65, GAD 67, subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 5$ em camundongos com 21 DPN cujas mães foram tratadas com leite (controle) ou leite inoculado com *L. paracasei* (probiótico). Nessa avaliação, foram observadas diferenças significativas na expressão de GAD 65, GAD 67 e subunidades $\alpha 3$ do receptor GABA A. * representa $p < 0,05$; **, $p < 0,01$. N = 6.

5.2 Avaliação Comportamental

No teste do campo aberto (Figura 18), foi observado que os animais cujas mães foram submetidas à suplementação com probiótico tiveram um aumento do número de quadrantes centrais percorridos ($35,0 \pm 2,65$ vs. $24,9 \pm 3,93$, $p = 0,04$), maior razão central ($0,34 \pm 0,03$ vs. $0,24 \pm 0,02$, $p = 0,02$) e maior tempo de permanência na área central ($56,5 \pm 7,00$ s. vs. $35,2 \pm 6,71$ s, $p = 0,04$) do que os do grupo controle. Ambos parâmetros estão associados com comportamento semelhante à ansiedade. Além disso, observamos um aumento no número de bolos fecais nos animais do grupo tratado, o que pode indicar uma alteração da motilidade gastrointestinal ($5,27 \pm 0,33$ vs. $3,90 \pm 0,51$, $p = 0,03$). Também foi observada uma tendência à redução do tempo de grooming ($p = 0,06$).

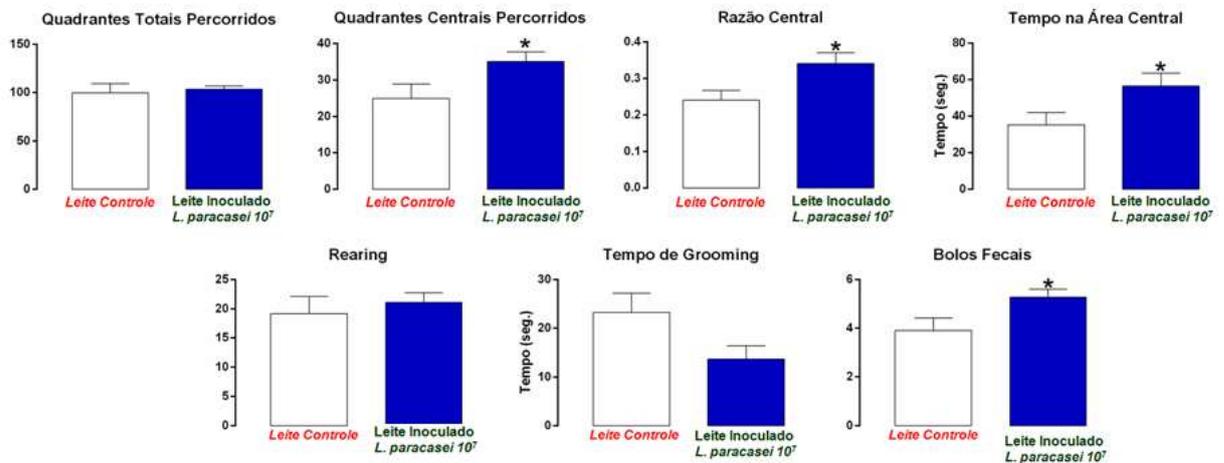


Figura 18: Avaliação da atividade exploratória e do comportamento semelhante à ansiedade em camundongos com 70 DPN cujas mães foram tratadas com leite (controle) ou leite inoculado com *L. paracasei* (probiótico) através do teste do campo aberto. Nesse protocolo, foi demonstrado que o grupo tratado teve menor comportamento semelhante à ansiedade. * representa $p < 0,05$. N=12.

Na caixa claro-escuro (Figura 19), a suplementação materna com probióticos promoveu diferenças significativas na latência ($19,9 \pm 2,89$ s vs. $67,8 \pm 17,4$ s, $p = 0,01$). Já no teste do labirinto em cruz elevado (Figura 22), os animais tratados tiveram menor número de SAP ($147,5 \pm 36,7$ s vs. $17,5 \pm 1,83$ s, $p = 0,006$) quando comparados ao grupo controle. Também observamos uma tendência ao aumento do tempo ($p = 0,08$) e porcentagem de entrada nos braços abertos ($p = 0,07$). Mais uma vez, tais alterações indicam que o referido tratamento promove uma redução do comportamento semelhante à ansiedade.

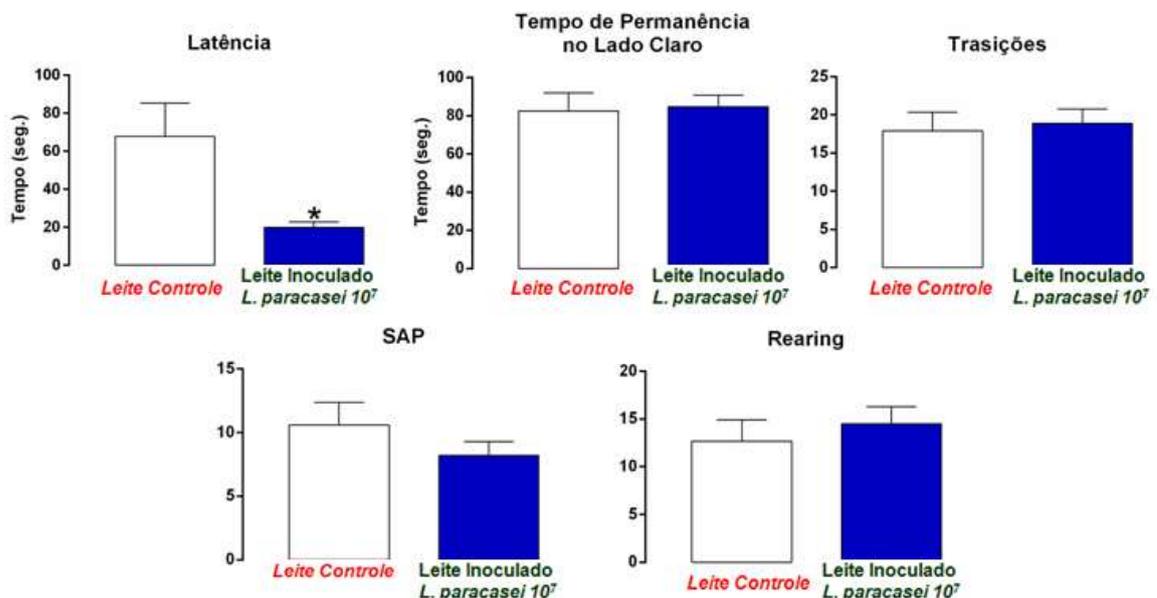


Figura 19: Avaliação do comportamento semelhante à ansiedade em camundongos com 70 DPN cujas mães foram tratadas com leite (controle) ou leite inoculado com *L. paracasei* (probiótico) através do teste da caixa claro-escuro. Nesse protocolo, foi demonstrado que o grupo tratado teve menor comportamento semelhante à ansiedade. * representa $p < 0,05$. N=12.

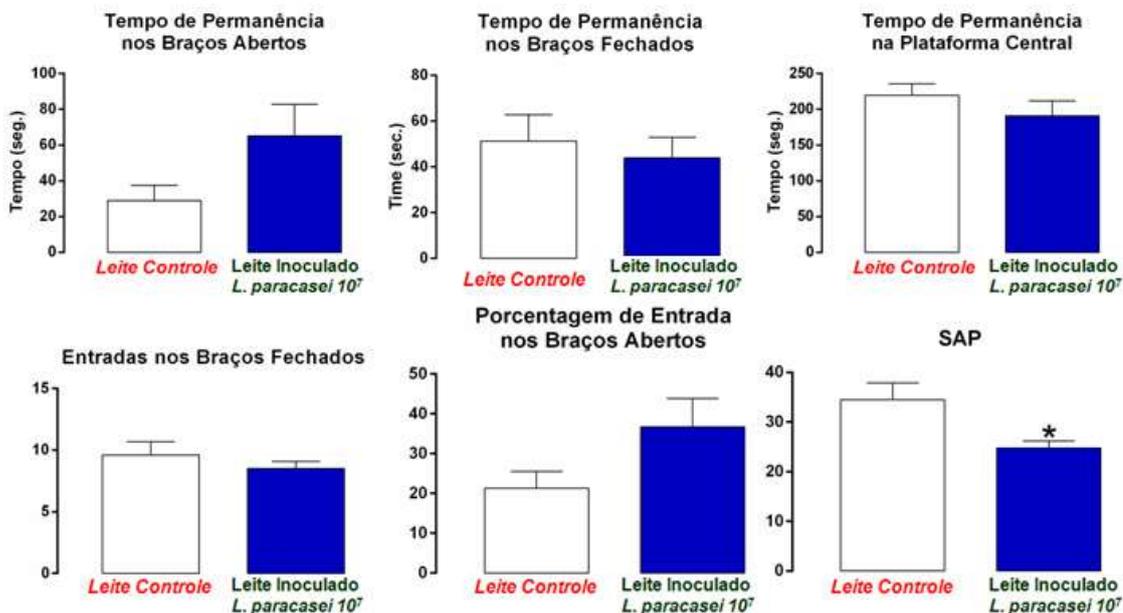


Figura 20: Avaliação do comportamento semelhante à ansiedade em camundongos com 70 DPN cujas mães foram tratadas com leite (controle) ou leite inoculado com *L. paracasei* (probiótico) através do teste do labirinto em cruz elevado. Nesse protocolo, foi demonstrado que o grupo tratado teve menor comportamento semelhante à ansiedade. * representa $p < 0,05$. N=12.

No teste da suspensão pela cauda (Figura 21), não verificamos diferenças significativas ($p > 0,05$) em nenhum dos parâmetros avaliados, o que indica que a suplementação materna com probióticos, apesar de ser capaz de reprogramar os mecanismos neurobiológicos envolvidos com o comportamento semelhante à ansiedade, não altera o comportamento semelhante à depressão.

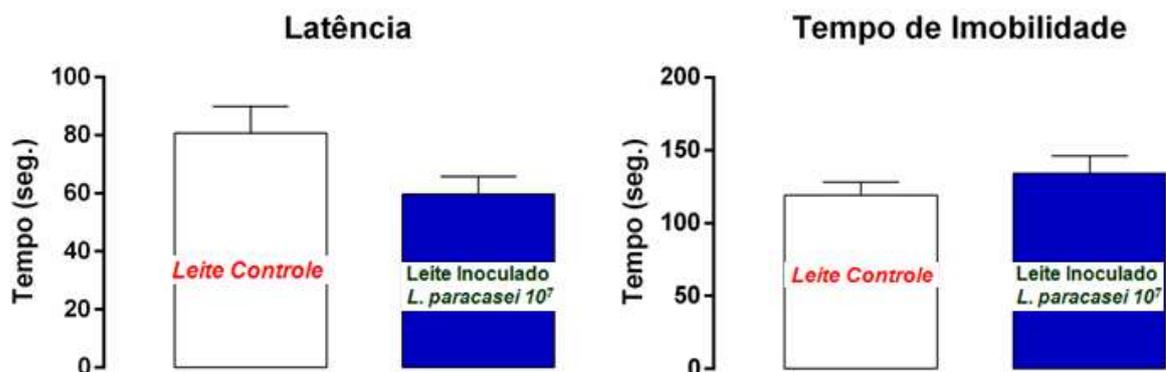


Figura 21: Avaliação do comportamento semelhante à depressão em camundongos com 70 DPN cujas mães foram tratadas com leite (controle) ou leite inoculado com *L. paracasei* (probiótico) através do teste da suspensão pela cauda. Nesse protocolo, não foram verificadas diferenças significativas. N=12.

7 DISCUSSÃO

Até onde sabemos, esse é o primeiro trabalho a investigar os impactos neurocomportamentais da suplementação materna com lactobacilos durante a gravidez e lactação em prole saudável de camundongos. De acordo com nossos resultados, esse tratamento modificou o perfil transcricional do sistema gabaérgico, promovendo alterações comportamentais a longo prazo na prole adulta, caracterizadas por baixa ansiedade.

Um trabalho elegante que apoia nossos resultados foi publicado por Bravo e colaboradores (2011). Embora este estudo tenha utilizado animais adultos não programados, este grupo verificou que a suplementação com *Lactobacillus rhamnosus* promoveu alterações dependentes da região em receptores GABA metabotrópicos e ionotrópicos. Por outro lado, Liang e colaboradores (2017) mostraram que a disbiose intestinal no início da vida também induz a redução da expressão das subunidades $\alpha 5$ e δ do receptor GABA_A no hipocampo de camundongos adultos. No entanto, essas alterações foram melhor revertidas pela administração de probióticos do que com o tratamento usual com benzodiazepínicos. Para explicar essas características transcricionais, precisamos destacar uma propriedade importante dos lactobacilos: esses microrganismos, incluindo *L. paracasei*, expressam enzimas sintetizadoras de GABA (KOMATSUZAKI et al., 2008). Em tais bactérias, a produção de GABA intracelular confere resistência ao pH ácido (FEEHILY & KARATZAS, 2013). É possível que os produtos da microbiota intestinal, incluindo o GABA, exerçam um papel de modulação epigenética no sistema nervoso central, promovendo mudanças na transcrição neuronal e, eventualmente, alterando o comportamento do hospedeiro não apenas no início da vida, mas também na idade adulta.

De acordo com a literatura, o eixo microbioma-intestino-cérebro parece desempenhar um papel importante nos níveis de BDNF e 5-HT do hipocampo. Em camundongos estéreis, os níveis de RNAm para BDNF foram diminuídos na região CA1 do hipocampo em comparação com animais controle (DIAZ HEIJTZ et al., 2011) e diminuíram de forma semelhante após o tratamento antibiótico de camundongos livres de patógenos específicos (FROHLICH et al., 2016). Camundongos estéreis também exibiram aumentos substanciais nos níveis de 5-HT no hipocampo (Clarke et al., 2013). De fato, existem poucos trabalhos que correlacionam a suplementação com probióticos e a regulação dos genes acima mencionados. No entanto, a administração crônica de *Lactobacillus rhamnosus* altera a expressão de genes relacionados com sistema serotoninérgico e Bdnf em cérebros de peixe-zebra (BORRELLI et al., 2016). Ao contrário do que foi observado no sistema GABAérgico, não foram verificadas alterações transcricionais nos genes que codificam BDNF, TH e TPH2. Embora não tenhamos verificado diferenças, precisamos lembrar que a expressão gênica não está necessariamente relacionada com atividade e expressão protéica. Assim, mais estudos serão necessários para avaliar o impacto da suplementação materna com probiótico na neuroquímica da prole.

Do ponto de vista neurocomportamental, mostramos que o tratamento com probiótico durante a prenhez e lactação promove efeitos ansiolíticos no teste de campo aberto (aumento do tempo na área central e razão central), na caixa claro-escuro (diminuição da latência para o ambiente claro) e no teste labirinto em cruz elevado (número de SAP). No labirinto em cruz elevado, houve uma tendência de aumentar o tempo e a porcentagem de entradas em braços abertos. No entanto, como demonstrado anteriormente, o SAP é um comportamento natural observado em roedores sob avaliação de risco e fundamentalmente pode ser mais sensível para estimar os níveis de ansiedade do que medidas espaço-temporais neste protocolo (MOLEWIJK et al., 1995). Para reforçar os resultados obtidos, evidências experimentais demonstram que o tratamento com *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium* é capaz

de reduzir o comportamento relacionado ao estresse na prole adulta submetido a um modelo de estresse precoce induzido pela separação materna (GAREAU et al., 2007; DESBONNET et al. al., 2010; COWAN et al., 2016; MCVEY NEUFELD et al., 2017). Na maioria desses estudos, o tratamento com probiótico normaliza a liberação de corticosterona. Além disso, de acordo com Mc Vey-Neufeld e colaboradores, o tratamento com probióticos também restaura a expressão de receptores de glicocorticoides no hipocampo. Em conjunto, esses achados sugerem que as bactérias probióticas podem restabelecer o ponto de ajuste do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal alterado pelo estresse no início da vida.

Outro trabalho que nos ajuda a entender o potencial uso terapêutico da suplementação materna com probiótico foi publicado por Hsiao e coautores (2013). Este grupo observou que em modelo de ativação imunológica precoce induz comportamento relacionado ao autismo em filhotes adultos. Esses animais apresentam um perfil metabólico no plasma alterado. Alguns desses metabólitos também promovem o comportamento relacionado ao autismo em animais não programados. Curiosamente, o tratamento com *Bacterioides fragilis* reverte essas anormalidades comportamentais em ambos os protocolos. Este fato levanta a possibilidade de que bactérias probióticas possam promover efeitos benéficos no hospedeiro, alterando o perfil de metabólitos. É importante ressaltar que o comportamento ansiolítico observado em nosso estudo também pode estar relacionado à modulação do sistema GABAérgico no período perinatal induzida pela suplementação materna com probiótico, sendo este perfil transcricional importante para a programação de fenótipos neurocomportamentais na vida adulta. Mais estudos serão necessários para investigar essa hipótese em filhotes programados.

8 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que a suplementação materna com probióticos durante o período de prenhez e lactação afeta o desenvolvimento ontogênico da prole, proporcionando alterações:

- A suplementação materna com probiótico durante a prenhez e lactação causou redução significativa da expressão hipocampal dos genes que codificam as enzimas GAD, na subunidade $\alpha 3$ do receptor GABA A, além de uma tendência à infra-regulação da TH da na prole com 21 DPN. Apesar da redução na expressão dos genes que codificam esse neurotransmissor a prole apresentou comportamento de menor ansiedade observado no teste do campo aberto, labirinto em cruz elevado e caixa claro-escuro.
- Acredita-se que os produtos da microbiota intestinal, incluindo o GABA sintetizado por *Lactobacillus*, exerçam um papel de modulação epigenética no sistema nervoso central, promovendo mudanças na transcrição neuronal e, eventualmente, alterando o comportamento do hospedeiro não apenas no início da vida, mas também na idade adulta

Mais estudos serão necessários para entender os mecanismos epigenéticos pelos quais esse tratamento programa o perfil neuroquímico da prole. Além disso, precisamos estudar não apenas a relação entre o eixo perinatal cérebro-intestino-microbioma e os distúrbios afetivos, mas também sua implicação com outras doenças psiquiátricas, tais como: autismo, esquizofrenia e transtorno do déficit de atenção e hiperatividade. Sem dúvida, o microbioma pode afetar a interação gene-ambiente,

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAGAARD, K.; MA, J.; ANTONY, K. M.; GANU, R.; PETROSINO, J.; VERSALOVIC, J. The placenta harbors a unique microbiome. **Science translational medicine**, v. 6, n. 237, p. 65-237 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos Para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 03 mai. 1999. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/18_99.htm

AIT-BELGNAOUI, A.; COLOM, A.; BRANISTE, V.; RAMALHO, L.; MARROT, A.; CARTIER, C.; TOMPKINS, T. O. Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 26, n. 4, p. 510-520, 2014.

AL-AJEELI, F.; FLAYYIH, M.; LKHAZRAJY, L. Study the effect of probiotic consumption on the Iraqi human body weight and lipid profile. **EurJ Biol Med Sci Res**, v. 3, p. 52-61, 2015.

ALJEWICZ, M.; CICHOSZ, G. Protective effects of Lactobacillus cultures in Dutch-type cheese-like products. **LWT-Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 52-56, 2015.

ALMEIDA, L. B.; MARINHO, C. B.; SOUZA, C. S.; CHEIB, V. B. P. Disbiose intestinal. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**. v. 24, n. 1, p. 58-65. 2009.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION et al. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5)**. American Psychiatric Pub, 2013.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. 5th ed. DSM-5. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing; 2013.

ANANDHARAJ, M.; SIVASANKARI, B. Isolation of potential probiotic Lactobacillus oris HMI68 from mother's milk with cholesterol-reducing property. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 118, n. 2, p. 153-159, 2014.

ANDRIGHETTO, C.; ZAMPESE, L.; LOMBARDI, A. RAPD-PCR Characterization of lactobacilli isolated from artisanal meat plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 26-30, 2001.

ANVISA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Jul. 2008. Disponível em: Acesso em: 15 nov. 2017

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.

AURELI, P.; CAPURSO, L.; CASTELLAZZI, A. M.; CLERICI, M.; GIOVANNINI, M.; MORELLI, L.; ZUCCOTTI, G. V. Probiotics and health: an evidence-based review. **Pharmacological research**, v. 63, n. 5, p. 366-376, 2011.

AVERSHINA, E.; STORRO, O.; OIEN, T.; JOHNSEN, R.; POPE, P.; RUDI, K. Major faecal microbiota shifts in composition and diversity with age in a geographically restricted cohort of mothers and their children. **FEMS microbiology ecology**, v. 87, n. 1, p. 280-290, 2014.

AZAD, M. B.; KONYA, T.; MAUGHAN, H.; GUTTMAN, D. S.; FIELD, C. J.; CHARI, R. S.; KOZYRSKYJ, A. L. Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. **Canadian Medical Association Journal**, v. 185, n. 5, p. 385-394, 2013.

BARKER, D. JP.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **The Lancet**, v. 327, n. 8489, p. 1077-1081, 1986.

BARLOW, D. H. Unraveling the mysteries of anxiety and its disorders from the perspective of emotion theory. **American psychologist**, v. 55, n. 11, p. 1247, 2000.

BAXTER, A. J.; SCOTT, K. M.; VOS, T.; WHITEFORD, H. A. Global prevalence of anxiety disorders: a systematic review and meta-regression. **Psychological medicine**, v. 43, n. 5, p. 897-910, 2013.

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.

BHARDWAJ, P.; KRISHNAPPA, S. Various approaches for prevention of dental caries with emphasis on probiotics: a review. **IOSR J Dent Med Sci**, v. 13, p. 62-7, 2014.

BISANZ, J. E.; ENOS, M. K.; PRAYGOD, G.; SENEY, S.; MACKLAIM, J. M.; CHILTON, S.; GLOOR, G. B. Microbiota at multiple body sites during pregnancy in a rural Tanzanian population and effects of moringa-supplemented probiotic yogurt. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 15, p. 4965-4975, 2015.

BORRELLI, Luca et al. Probiotic modulation of the microbiota-gut-brain axis and behaviour in zebrafish. **Scientific reports**, v. 6, p. srep30046, 2016.

BOURDICHON, F.; CASAREGOLA, S.; FARROKH, C.; FRISVAD, J. C.; GERDS, M. L.; HAMMES, W. P.; POWELL, I. B. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. **International journal of food microbiology**, v. 154, n. 3, p. 87-97, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA, Resolução nº 18. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, abril de 1999. ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **IX-Lista de Alegações de Propriedade Funcional Aprovadas**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 01/10/2015.

BRAVO, J. A.; FORSYTHE, P.; CHEW, M. V.; ESCARAVAGE, E.; SAVIGNAC, H. M.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 38, p. 16050-16055, 2011.

BRAVO, Javier A. et al. Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 38, p. 16050-16055, 2011.

BURSTEIN, M.; GEORGIADES, K.; HE, J. P.; SCHMITZ, A.; FEIG, E.; KHAZANOV, G. K., MERIKANGAS, K. Specific phobia among US adolescents: phenomenology and typology. **Depression and anxiety**, v. 29, n. 12, p. 1072-1082, 2012.

BUSS, C.; DAVIS, E. P.; SHAHBABA, B.; PRUESSNER, J. C.; HEAD, K.; SANDMAN, C. A. Maternal cortisol over the course of pregnancy and subsequent child amygdala and hippocampus volumes and affective problems. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 20, p. 1312-1319, 2012.

CARVALHO M. D.; TOMIE I. B., R.; GUIMARÃES L. M.; SUELY C; A. S.; ALVES S. M. M.; FÁTIMA F. M. I.; BERTI A. B. M. Doenças crônicas não transmissíveis e a utilização de serviços de saúde: análise da Pesquisa Nacional de Saúde no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, 2017.

CARVALHO, F. L. O.; UYEDA, M.; DEL BUONOM, H. C.; GONZAGA, M. F. N. PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS: benefícios acerca da literatura. **Revista de Saúde UniAGES**, v. 1, n. 1, p. 58-87, 2017.

CERDÓ, T.; RUÍZ, A.; SUÁREZ, A.; CAMPOY, C. Probiotic, Prebiotic, and Brain Development. **Nutrients**, v. 9, n. 11, p. 1247-1266, 2017.

CHAN, Y. K.; ESTAKI, M.; GIBSON, D.L. Clinical Consequences of Diet-Induced Dysbiosis. **Ann. Nutr. Metab.**; v. 63, suppl. 2, p. 28-40, 2013.

CHELULE, P. K.; MOKOENA, M. P.; GQALENI, N. Advantages of traditional lactic acid bacteria fermentation of food in Africa. **Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**, v. 2, p. 1160-1167, 2010.

CHONG, E. S. L. A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 351-374, 2014.

CLARKE, G. et al. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. **Molecular psychiatry**, v. 18, n. 6, p. 666, 2013.

CONRADO, Bruna Ágata et al. Disbiose Intestinal em idosos e aplicabilidade dos probióticos e prebióticos. **Cadernos UniFOA**, Volta Redonda, n. 36, p. 71-78, abr. 2018.

- COWAN, C. S. M.; CALLAGHAN, B. L.; RICHARDSON, R. The effects of a probiotic formulation (*Lactobacillus rhamnosus* and *L. helveticus*) on developmental trajectories of emotional learning in stressed infant rats. **Translational psychiatry**, v. 6, n. 5, p. e823, 2016.
- CRASKE, M. G. Anxiety disorders. **Nature Reviews Disease Primers**, v.3, n. 17024, p. 1-18, 2017.
- CRASKE, M. G.; RAUCH, S. L.; URSANO, R.; PRENOVEAU, J.; PINE, D. S.; ZINBARG, R. E. What is an anxiety disorder?, **Depression and anxiety**, v. 26, n. 12, p. 1066-1085, 2009.
- CRASKE, M. G.; STEIN, M. B. Anxiety. **The Lancet**, v.388, n.10063, p. 3048-3059, 2016.
- CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 13, n. 2, p. 167-170, 1980.
- DALGALARRONDO, P. **Psicopatologia e semiologia dos transtornos mentais**. Artmed Editora, 2009.
- DAVIS, C. P.; MCALLISTER, J. S.; SAVAGE, D. C. Microbial colonization of the intestinal epithelium in suckling mice. **Infection and Immunity**, v. 7, n. 4, p. 666-672, 1973.
- DAVIS, EP.; GLYNN, LM.; SCHETTER, CD.; HOBEL, C.; CHICZ-DEMET, A.; SANDMAN, CA. Prenatal exposure to maternal depression and cortisol influences infant temperament. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 46, n. 6, p. 737-746, 2007.
- DE VUYST, L.; LEROY, F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 194-199, 2007.
- DELZENNE NM, NEYRINCK AM, BACKHED F, CANI PD. Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, n. 11, p. 639-646, 2011.
- DENNIS, C. L.; BROWN, H. K.; FALAH-HASSANI, K.; MARINI, F. C.; VIGOD, S. N. Identifying women at risk for sustained postpartum anxiety. **Journal of Affective Disorders**, v. 213, p. 131-137, 2017.
- DESBONNET, L. et al. Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. **Neuroscience**, v. 170, n. 4, p. 1179-1188, 2010.
- DESBONNET, L.; GARRETT, L.; CLARKE, G.; BIENENSTOCK, J.; DINAN, T. G. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: an assessment of potential antidepressant properties in the rat. **Journal of psychiatric research**, v. 43, n. 2, p. 164-174, 2008.
- DHAKAL, R.; BAJPAI, V. K.; BAEK, KH. Production of GABA (γ -aminobutyric acid) by microorganisms: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1230-1241, 2012.

DINAN, T. G.; STANTON, C.; CRYAN, J. F. Psychobiotics: a novel class of psychotropic. *Biological psychiatry*, v. 74, n. 10, p. 720-726, 2013.

DOMINGUEZ-BELLO, M. G.; COSTELLO, E. K.; CONTRERAS, M., MAGRIS, M.; HIDALGO, G.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 26, p. 11971-11975, 2010.

DOTTERUD, CK. STORRO, O.; JOHNSEN, R.; OIEN, T. Probióticos em mulheres grávidas para prevenir doenças alérgicas: um estudo randomizado, duplo-cego. **British Journal of Dermatology**, v. 163, n. 3, p. 616-623, 2010.

DUNCAN, S. H.; FLINT, H. J. Probiotics and prebiotics and health in ageing populations. **Maturitas**, v. 75, n. 1, p. 44-50, 2013.

EFSA - European Food Safety Authority Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to *Lactobacillus paracasei* LPC 01 (CNCM I-1390) and treatment of disease (ID 3055, further assessment) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006 EFSA Journal, p. 1-14, 2012.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Probiotics in Food, Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. World Health Organization and Food and Agricultural Organization of the United Nations. Roma, 2006.

FEEHILY, Conor; KARATZAS, K. A. G. Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. **Journal of applied microbiology**, v. 114, n. 1, p. 11-24, 2013.

FERREIRA B., F. H.; JARDIM L. B. L. P.; SILVA B. L. H.; FIGUEIRA A. F. Probióticos-microrganismos a favor da vida. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 11, n. 1, 2011.

FRANCO, M. M.. Epigenetics in genetic improvement and animal reproduction. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v. 25, n. 1-2, 2017.

FRIC, P. Probiotics and prebiotics—renaissance of a therapeutic principle. **Open Medicine**, v. 2, n. 3, p. 237-270, 2007.

FRÖHLICH, Esther E. et al. Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: analysis of gut microbiota-brain communication. **Brain, behavior, and immunity**, v. 56, p. 140-155, 2016.

FUNKHOUSER, L. J.; BORDENSTEIN, S. R. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. **PLoS biology**, v. 11, n. 8, p. 1-9, 2013

GAREAU, Mélanie G. et al. Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation. **Gut**, v. 56, n. 11, p. 1522-1528, 2007.

GAVANSKI, D. S.; BARATTO, I.; GATTI, R. S. Avaliação do hábito intestinal e ingestão de fibras alimentares em uma população de idosos. **Revista brasileira de obesidade, nutrição e emagrecimento**, São Paulo. v.9. n.49. p.3-11, 2015.

GHOSHAL, U. C.; GWEE, K. A.; HOLTMANN, G.; LI, Y.; PARK, S. J.; SIMADIBRATA, M.; SUGANO, K.; WU, K.; QUIGLEY, E. M.; COHEN, H. The Role of the Microbiome and the use Of Probiotics in Gastrointestinal Disorders in Adults in the Asia-Pacific Region. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. 2017.

GOUDARZI, M.; GOUDARZI, H.; RASHIDAN, M. Probiotics: an update on mechanisms of action and clinical applications. **Novelty in Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. 22-30, 2014.

GROVER, S.; RASHMI, H. M.; SRIVASTAVA, A. K.; BATISH, V. K. Probiotics for human health—new innovations and emerging trends. **Gut pathogens**, v. 4, n. 1, p. 15, 2012..

GUARNER, F.; KHAN, A. G.; GARISCH, J.; ELIAKIM, R.; GANGL, A.; THOMSON, A.; FEDORAK, R. Probióticos y prebióticos. Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: **Probióticos y prebióticos**, p. 1-29, 2011.

GUEIMONDE, M.; SAKATA, S.; KALLIOMÄKI, M.; ISOLAURI, E.; BENNO, Y.; SALMINEN, S. Effect of maternal consumption of lactobacillus GG on transfer and establishment of fecal bifidobacterial microbiota in neonates. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 42, n. 2, p. 166-170, 2006.

HARTEMINK, R.; DOMENECH, V. R.; ROMBOUITS, F. M. New selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. **Journal of microbiological methods**, v. 29, n. 2, p. 77-84, 1997.

HASHEMI, A.; VILLA, Christopher R.; COMELLI, E. M. Probiotics in early life: a preventative and treatment approach. **Food & function**, v. 7, n. 4, p. 1752-1768, 2016.

HAWRELAK, J. A; MYERS, S. P. The Causes of Intestinal Dysbiosis: **A Review. Alternative Medicine Review**, v. 9, n. 2, p. 180-197, 2004.

HEANEY, R. P. Is Vitamin D Inadequacy in Early Life an Instance of the “Barker Hypothesis”? **Nutrition today**, v. 51, n. 1, p. 14, 2016.

HEIJTZ, Rochellys Diaz et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 7, p. 3047-3052, 2011.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; CALDER, P. C. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506-514, 2014.

HOLMES, A. J.; LEE, P. H.; HOLLINSHEAD, M. O.; BAKST, L.; ROFFMAN, J. L.; SMOLLER, J. W.; BUCKNER, R. L. Individual differences in amygdala-medial prefrontal anatomy link negative affect, impaired social functioning, and polygenic depression risk. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 50, p. 18087-18100, 2012.

HSIAO, Elaine Y. et al. The microbiota modulates gut physiology and behavioral abnormalities associated with autism. **Cell**, v. 155, n. 7, p. 1451, 2013.

HUANG, R.; WANG, K.; HU, J. Effect of probiotics on depression: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Nutrients**, v. 8, n. 8, p. 483, 2016.

HUURRE, A.; LAITINEN, K.; RAUTAVA, S.; KORKEAMÄKI, M.; ISOLAURI, E. Impacto da atopia materna e suplementação probiótica durante a prenhez na sensibilização infantil: um estudo duplo-cego controlado por placebo. **Alergia Clínica e Experimental**, v. 38, n. 8, p. 1342-1348, 2008.

IANNITTI, T.; PALMIERI, B. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. **Clinical nutrition**, v. 29, n. 6, p. 701-725, 2010.

ILMONEN, J.; ISOLAURI, E.; POUSSA, T.; LAITINEN, K. Impact of dietary counselling and probiotic intervention on maternal anthropometric measurements during and after pregnancy: a randomized placebo-controlled trial. **Clinical Nutrition**, v. 30, n. 2, p. 156-164, 2011.

ISOLAURI, E.; SÜTAS, Y.; KANKAANPÄÄ, P.; ARVILOMMI, H.; SALMINEN, S. Probiotics: effects on immunity. **The American journal of clinical nutrition**, v. 73, n. 2, p. 444-450, 2001.

JIMÉNEZ, E.; FERNÁNDEZ, L.; MARÍN, M. L.; MARTÍN, R.; ODRIOZOLA, J. M.; NUENO-PALOP, C.; RODRÍGUEZ, J. M. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. **Current microbiology**, v. 51, n. 4, p. 270-274, 2005.

KALLIOMÄKI, M.; SALMINEN, S.; POUSSA, T.; ARVILOMMI, H.; ISOLAURI, E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 361, n. 9372, p. 1869-1871, 2003.

KAPUT, J.; RODRIGUEZ, R. L. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. **Physiological genomics**, v. 16, n. 2, p. 166-177, 2004.

KARAGIANNIS, T. C.; MAULIK, N. Factors influencing epigenetic mechanisms and related diseases. p. 192-194, 2012.

KAYSER, M. Forensic DNA Phenotyping: DNA testing for externally visible characteristics. **Encyclopedia of forensic sciences**. Academic, Waltham, p. 369-374, 2013.

KIM, H. J.; KIM, Y. J.; LEE, S. H.; KANG, M. J.; YU, H. S.; JUNG, Y. H.; YU, J. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* on asthma with an adoptive transfer of dendritic cells in mice. **Journal of applied microbiology**, v. 115, n. 3, p. 872-879, 2013.

KOMATSUZAKI, Noriko et al. Characterization of glutamate decarboxylase from a high γ -aminobutyric acid (GABA)-producer, *Lactobacillus paracasei*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 72, n. 2, p. 278-285, 2008.

KOREN, O.; GOODRICH, J. K.; CULLENDER, T. C.; SPOR, A.; LAITINEN, K.; BÄCKHED, H. K.; BÄCKHED, F. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. **Cell**, v. 150, n. 3, p. 470-480, 2012.

KUMAR, M.; NAGPAL, R.; KUMAR, R.; HEMALATHA, R.; VERMA, V.; KUMAR, A.; YADAV, H. Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. **Experimental diabetes research**, v. 2012, 2012.

LAITINEN, K.; POUSSA, T.; ISOLAURI, E. Probiotics and dietary counselling contribute to glucose regulation during and after pregnancy: a randomised controlled trial. **British journal of nutrition**, v. 101, n. 11, p. 1679-1687, 2008.

LEONARD, B. E. The concept of depression as a dysfunction of the immune system. In: **Depression: From Psychopathology to Pharmacotherapy**. Karger Publishers, p. 53-71, 2010.

LIANG, Liang et al. Effects of gut microbiota disturbance induced in early life on the expression of extrasynaptic GABA-A receptor $\alpha 5$ and δ subunits in the hippocampus of adult rats. **Brain research bulletin**, v. 135, p. 113-119, 2017.

LILLY, D.; STILLWELL, R. Probiotics, growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, n. 38, p. 747-748, 1965.

LINDBLOM, R.; VERVERIS, K.; TORTORELLA, S. M.; KARAGIANNIS, T. C. The early life origin theory in the development of cardiovascular disease and type 2 diabetes. **Molecular biology reports**, v. 42, n. 4, p. 791-797, 2015.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LUCHESE, R. H. Microbial Interactions in the Gut: The Role of Bioactive Components in Milk and Honey. In: **Probiotics**. InTech, 2012.

LUNDY, B.; FIELD, T.; PICKENS, J. Newborns of mothers with depressive symptoms are less expressive. **Infant Behavior and Development**, v. 19, n. 4, p. 419-424, 1996.

LUOTO, R.; LAITINEN, K.; NERMES, M.; ISOLAURI, E. Impact of maternal probiotic-supplemented dietary counselling on pregnancy outcome and prenatal and postnatal growth: a double-blind, placebo-controlled study. **British journal of nutrition**, v. 103, n. 12, p. 1792-1799, 2010.

LUPIEN, S. J.; PARENT, S.; EVANS, A. C.; TREMBLAY, R. E.; ZELAZO, P. D.; CORBO, V.; SÉGUIN, J. R. Larger amygdala but no change in hippocampal volume in 10-year-old children exposed to maternal depressive symptomatology since birth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 34, p. 14324-14329, 2011.

LYTE, M. Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: microbial endocrinology in the design and use of probiotics. **Bioessays**, v. 33, n. 8, p. 574-581, 2011.

MANN, Philippa; GREEN, Janet; WALKER, Karen. Twin-to-twin transfusion syndrome and potential applicability to the Barker hypothesis. **Journal of Neonatal Nursing**, v. 22, n. 5, p. 223-227, 2016.

MATOS, R. W. M.. Epigenética Forense. **Acta de Ciências e Saúde**, v. 1, n. 2, p. 1-22, 2017.
MCILWAIN, K. L.; MERRIWEATHER, M. Y.; YUVA-PAYLOR, L. A.; PAYLOR, R. The use of behavioral test batteries: effects of training history. **Physiology & behavior**, v. 73, n. 5, p. 705-717, 2001.

MCVEY NEUFELD, Karen-Anne et al. Neurobehavioural effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG alone and in combination with prebiotics polydextrose and galactooligosaccharide in male rats exposed to early-life stress. **Nutritional neuroscience**, p. 1-10, 2017.

MIAN, A. I. Depression in pregnancy and the postpartum period: balancing adverse effects of untreated illness with treatment risks. **Journal of Psychiatric Practice**, v. 11, n. 6, p. 389-396, 2005.

MIKICS, É.; BARSY, B.; BARSVÁRI, B.; HALLER, J. Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. **Hormones and behavior**, v. 48, n. 2, p. 152-162, 2005.

MOKOENA, M. P.; MUTANDA, T.; OLANIRAN, A. O. Perspectives on the probiotic potential of lactic acid bacteria from African traditional fermented foods and beverages. **Food & nutrition research**, v. 60, n. 1, p. 29630, 2016.

MOLEWIJK, H. E.; VAN DER POEL, A. M.; OLIVIER, B. The ambivalent behaviour “stretched approach posture” in the rat as a paradigm to characterize anxiolytic drugs. **Psychopharmacology**, v. 121, n. 1, p. 81-90, 1995.

MUNIZ, M.; FERNANDES, D. C. Autoconceito e ansiedade escolar: um estudo com alunos do ensino fundamental. **Psicologia Escolar e Educacional**, v. 20, n. 3, p. 427-436, 2016.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 39, n. 1, p. 13-126, 1999.

NASE L, SAVILAHTI E, SAXELIN M, PONKA T, POUSSA T, KORPELA R, MEURMAN JH. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. **Caries research**, v. 35, n. 6, p. 412-420, 2001.

NG, Q. X.; PETERS, C.; HO, C. Y. X.; YUTONG, D. L.; YEO, W. S. A Meta-Analysis of the Use of Probiotics to Alleviate Depressive Symptoms. **Journal of Affective Disorders**, 2017.

NIERS, L.; MARTÍN, R.; RIJKERS, G.; SENGERS, F.; TIMMERMAN, H.; VAN UDEN, N.; HOEKSTRA, M. The effects of selected probiotic strains on the development of eczema (the PandA study). **Allergy**, v. 64, n. 9, p. 1349-1358, 2009.

OLIVEIRA V. S.; MAIA P. C. G. G. S.; SANTOS J.; SOUSA M. N. A. Análise dos Fatores de Risco Para Doenças Crônicas Não Transmissíveis: Estudo com Colaboradores de uma Instituição Privada. **Saúde (Santa Maria)**, v. 43, n. 1, p. 214-224, 2017

OTTE, C., GOLD, S. M., PENNINX, B. W., PARIANTE, C. M., ETKIN, A., FAVA, M., SCHATZBERG, A. F. Major depressive disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16065, 2016.

PAWLBY, S.; HAY, D.F.; SHARP, D.; WATERS, C.S.; O'KEANE, V. Antenatal depression predicts depression in adolescent offspring: prospective longitudinal community-based study. **Journal of affective disorders**, v. 113, n. 3, p. 236-243, 2009.

PEARSON, R. M.; EVANS, J.; KOUNALI, D.; LEWIS, G.; HERON, J.; RAMCHANDANI, P. G.; STEIN, A. Maternal depression during pregnancy and the postnatal period: risks and possible mechanisms for offspring depression at age 18 years. **JAMA psychiatry**, v. 70, n. 12, p. 1312-1319, 2013.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

PEREZ, P.F.; DORÉ, J.; LECLERC, M.; LEVENEZ, F.; BENYACOU, J.; SERRANT, P.; DONNET-HUGHES, A. Impressão bacteriana do sistema imunológico neonatal: lições das células maternas. **Pediatria**, v. 119, n. 3, p. 724-732, 2007.

PÉREZ-PADILLA, E. A.; CERVANTES-RAMÍREZ, V. M.; HIJUELOS-GARCÍA, N. A.; PINEDA-CORTÉS, J. C.; SALGADO-BURGOS, H. Prevalencia, causas y tratamiento de la depresión Mayor. **Rev Biomed**, v. 28, p. 89-115, 2017.

PORSOLT, R.D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-2, 1977.

POUWELS, P. H.; LEER, R. J.; SHAW, M.; DEN BAK-GLASHOUWER, M. J. H.; TIELEN, F. D.; SMIT, E.; CONWAY, P. L. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. **International journal of food microbiology**, v. 41, n. 2, p. 155-167, 1998.

PRADO, F. C.; PARADA, J. L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Trends in non-dairy probiotic beverages. **Food Research International**, v. 41, n. 2, p. 111-123, 2008.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1, p. 3-33, 2003.

PUNDIR, R. K.; RANA, S.; KASHYAP, N.; KAUR, A. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from food samples: an in vitro study. 2013.

QIU, A.; ANH, T. T.; LI, Y.; CHEN, H.; RIFKIN-GRABOI, A.; BROEKMAN, B. F.; FORTIER, M. V. Prenatal maternal depression alters amygdala functional connectivity in 6-month-old infants. **Translational psychiatry**, v. 5, n. 2, p. 508-514, 2015.

RATTANACHAIKUNSOPON P., PHUMKHACHORN P. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. **Annals of biological research**, v. 1, n. 4, p. 218-228, 2010.

RAUTAVA, S.; COLLADO, M. C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics modulate host-microbe interaction in the placenta and fetal gut: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Neonatology**, v. 102, n. 3, p. 178-184, 2012.

- REDMAN, M. G.; WARD, E. J.; PHILLIPS, R. S. The efficacy and safety of probiotics in people with cancer: a systematic review. **Annals of Oncology**, v. 25, n. 10, p. 1919-1929, 2014.
- REID, G. Neuroactive probiotics. **Bioessays**, v. 33, n. 8, p. 562-562, 2011.
- RESCIGNO, M.; URBANO, M.; VALZASINA, B.; FRANCOLINI, M.; ROTTA, G., BONASIO, R.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. **Nature immunology**, v. 2, n. 4, 2001.
- ROTH, K. A.; KATZ, R. J. Stress, behavioral arousal, and open field activity—a reexamination of emotionality in the rat. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 3, n. 4, p. 247-263, 1980.
- ROUSSEAU, C; THURU, X; GELOT, A; BARNICH, N; NEUT, C; DUBUQUOY, L; DUBUQUOY, C; MEROUR, E; GEBOES, K; CHAMAILLARD, M; OUWEHAND, A; LEYER, G; CARCANO, D; COLOMBEL, JF; ARDID, D; DESREUMAUX, P. *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. **Nature medicine**, v. 13, n. 1, p. 35, 2007.
- ROWLAND, I. R.; CAPURSO, L.; COLLINS, K.; CUMMINGS, J.; DELZENNE, N.; GOULET, O.; MEIER, R. Current level of consensus on probiotic science—Report of an expert meeting—London, 23 November 2009: Report of an expert meeting—London, 23 November 2009. 2010.
- RUSCIO, A. M.; BROWN, T; A., CHIU, W. T.; SAREEN, J.; STEIN, M. B.; KESSLER, R. C. Social fears and social phobia in the USA: results from the National Comorbidity Survey Replication. **Psychological medicine**, v. 38, n. 1, p. 15-28, 2008.
- SALVETTI, E.; O'TOOLE, P. W. When regulation challenges innovation: the case of the genus *Lactobacillus*. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 23, p. 187-194, 2017.
- SANDERS, M. E.; AKKERMANS, L. M.; HALLER, D.; HAMMERMAN, C.; HEIMBACH, J. T.; HÖRMANNSPERGER, G.; HUYS, G. Safety assessment of probiotics for human use. **Gut microbes**, v. 1, n. 3, p. 164-185, 2010.
- SARASWATHI, B.; BALAJI, A.; UMASHANKAR, M. S. Polymers in mucoadhesive drug delivery system—latest updates. **Int J Pharm Pharmaceut Sci**, v. 5, p. 423-30, 2013.
- SCHAEDLER, R. W.; DUBOS, R.; COSTELLO, R. The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 122, n. 1, p. 59-66, 1965.
- SCHMIDT, C. Mental health: thinking from the gut. **Nature**, v. 518, n. 7540, p. 12-15, 2015.
- SELHUB, E. M.; LOGAN, A. C.; BESTED, A. C. Fermented foods, microbiota, and mental health: ancient practice meets nutritional psychiatry. **Journal of physiological anthropology**, v. 33, n. 1, p. 2, 2014.

SELIGMAN, M.; WALKER, E.; ROSENHAN, D. **Abnormal psychology**, (4th Ed.). New York: W.W. Norton & Company, 2001.

SHANAHAN, F.; QUIGLEY, E. MM. Manipulation of the microbiota for treatment of IBS and IBD—challenges and controversies. **Gastroenterology**, v. 146, n. 6, p. 1554-1563, 2014.

SHINDE, P. B. Probiotic: an overview for selection and evaluation. **Int J Pharm and Pharm Sci**, v. 4, p. 14-21, 2012.

SILVA, D. D. S. D.; SILVA T. N. V.; ALEXANDRE, A. R. G.; FREITAS, D. A.; BRÊDA, M. Z.; ALBUQUERQUE, M. C. D. S.; MELO NETO, V. L. **Depressão e risco de suicídio entre profissionais de Enfermagem: revisão integrativa**. Revista da Escola de Enfermagem da USP, v. 49, n. 6, p. 1023-1031, 2015.

SOH, S. E.; AW, M.; GEREZ, I.; CHONG, Y. S.; RAUFF, M.; NG, Y. P. M.; SHEK, L. C. Probiotic supplementation in the first 6 months of life in at risk Asian infants—effects on eczema and atopic sensitization at the age of 1 year. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, n. 4, p. 571-578, 2009.

SOHR-PRESTON, S. L.; SCARAMELLA, L. V. Implications of timing of maternal depressive symptoms for early cognitive and language development. **Clinical child and family psychology review**, v. 9, n. 1, p. 65-83, 2006.

SPEYBROECK, L. From epigenesis to epigenetics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 981, n. 1, p. 61-81, 2002.

STEIN, M.B.; STEIN, D. J. Social anxiety disorder. **The Lancet**, v. 371, n. 9618, p. 1115-1125, 2008.

THUM, C.; COOKSON, A. L.; OTTER, D. E.; MCNABB, W. C.; HODGKINSON, A. J.; DYER, J.; ROY, N. C. Can nutritional modulation of maternal intestinal microbiota influence the development of the infant gastrointestinal tract. **The Journal of nutrition**, v. 142, n. 11, p. 1921-1928, 2012.

TURNER, J. D.; KIRSCHNER, S. A.; MOLITOR, A. M.; EVDOKIMOV, K.; MULLER, C. P. Epigenetics. **International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences (Second Edition)**, Elsevier, Oxford, p. 839-847, 2015.

VIDAKI, A.; DANIEL, Barbara; COURT, Denise Syndercombe. Forensic DNA methylation profiling—Potential opportunities and challenges. **Forensic Science International: Genetics**, v. 7, n. 5, p. 499-507, 2013.

WALKER, C. L.; HO, S. Developmental reprogramming of cancer susceptibility. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 7, 2012.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: A critical review. **Psychological bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482, 1976.

WENDLING, L. K.; WESCHENFER, S. Probióticos e alimentos lácteos fermentados-uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 395, p. 49-57, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. <http://www.who.int/mediacentre/news/en/> (2017).

YADAV, N. R.; BHITRE, M. J.; ANSARI, I. K. Probiotic delivery systems: applications, challenges and prospective. **Int Res J Pharm**, v. 4, p. 1-9, 2013.

ZUCCOTTI, G. V.; MENEGHIN, F.; RAIMONDI, C.; DILILLO, D.; AGOSTONI, C.; RIVA, E.; GIOVANNINI, M. Probiotics in clinical practice: an overview. **Journal of**