



Os testes in vitro permitem entender melhor os efeitos terapêuticos das estirpes de probiótico comercializadas

Paolo Pellegrino, Maria-Chiara Uboldi, Daniel Marquez e Marcos III Perez

O microbioma intestinal é único em cada pessoa e tem um grande impacto na saúde. Os probióticos administrados oralmente são usados na prevenção e/ou no tratamento de perturbações gastrointestinais (GI), além de mostrarem potencial no tratamento de problemas não-GI. Estudos in vitro resultaram numa melhor compreensão das propriedades biológicas dos microrganismos usados para fins terapêuticos e dos efeitos positivos que podem ter in vivo.

Dois estudos in vitro testaram propriedades de nove estirpes microbianas estabelecidas isoladas das preparações comerciais (ver **Tab. 1**) [1, 2]. Devido à complexidade do trato gastrointestinal, os resultados individuais in vitro não podem explicar definitivamente os efeitos fisiológicos. Mas dão-nos informações importantes para a investigação clínica e para a compreensão dos efeitos in vivo.

Probióticos e respetiva estabilidade em fluido intestinal simulado

As estirpes de probióticos investigadas exercem o seu efeito positivo no intestino, pelo que a estabilidade das células em condições intestinais simuladas é relevante (ver **Tab. 1**). Digna de nota é a capacidade de as várias estirpes de *B. clausii* (*Bacillus clausii* OC, NR, SIN, T) se multiplicarem depois de uma redução inicial na contagem de células sem fontes de nutrientes no fluido intestinal simulado (*B. clausii* SIN: redução passadas 2 h em comparação com t_0 [$p < 0,05$], proliferação passadas 8 h de incubação em comparação com 4 h [$p < 0,05$]). Passadas 8 horas, havia apenas uma ligeira redução de 0,240 log em comparação com t_0 . A tolerância de *B. clausii* e *B. coagulans* a condições intestinais simuladas está bem documentada considerando a sua capacidade de formar esporos em comparação com estirpes que não formam esporos, normalmente encontradas em produtos comerciais [1].

Probióticos e sua ligação a células hospedeiras

Os microrganismos probióticos podem competir com patógenos pelos locais de ligação mucosais e contrariar, assim, infeções causadas por organismos patogénicos. Para isso, é necessária aderência ao muco gastrointestinal. A incubação

de micróbios em ágar contendo mucinas porcinas é um método estabelecido para estudar este comportamento de ligação. As placas de ágar contendo mucina, bem como as isentas de mucina para controlo negativo, foram inoculadas com a suspensão bacteriana. As placas foram então incubadas a 37 °C em condições aeróbias e anaeróbias, tendo sido determinado o número de células (UFC [unidades formadoras de colónias]) por poço inoculado.

Nas estirpes *B. clausii*, *B. coagulans* e *B. breve*, as UFC/poço obtidas depois da incubação de mucinas em condições aeróbias e anaeróbias foi significativamente superior em comparação com os controlos negativos ($p < 0,05$ a $p < 0,001$). *L. reuteri* só aderiu a mucinas em condições anaeróbias ($p < 0,001$), *S. boulardii* só aderiu em condições aeróbias ($p < 0,01$) [1].

Probióticos para intolerância à lactose

Os probióticos podem produzir enzimas que decompõem os alimentos, como a β -galactosidase, que pode ajudar na digestão, p. ex., em pessoas com intolerância à lactose, ao reduzir potencialmente os sintomas digestivos. Todas as estirpes de *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. breve* e *L. reuteri* conseguiram produzir significativamente mais β -galactosidase do que o controlo negativo ($p < 0,01$ a $p < 0,001$) [1].

Probióticos para o stress oxidativo

Devido aos inúmeros processos metabólicos dentro das células, uma acumulação de espécies reativas de oxigénio (ROS) pode causar efeitos tóxicos. Probióticos que produzem antioxidantes, como catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), podem ajudar a reduzir o stress oxidativo. Todas as

estirpes testadas demonstraram a capacidade de produzir CAT e SOD [1].

Probióticos para o déficit vitamínico

Demonstrou-se que os probióticos produzem sobretudo vitaminas B, que poderiam ajudar na manutenção da eubiose intestinal e colmatar determinadas formas de deficiência. Microrganismos probióticos capazes de secretar riboflavina (vitamina B₂) poderiam compensar um déficit de vitamina B₂ do hospedeiro. O déficit de riboflavina costuma dever-se a uma dieta pobre em produtos ricos em riboflavina, sendo o déficit vitamínico mais comum nos países em vias de desenvolvimento. *B. clausii*, *B. coagulans* e *L. rhamnosus* conseguiram produzir riboflavina ($p < 0,001$ em comparação com o controlo negativo) [1].

Probióticos para ajudar no equilíbrio fisiológico através de ácidos gordos de cadeia curta (AGCC)

Durante a fermentação microbiana de hidratos de carbono complexos no intestino humano, são produzidos AGCC. Confirma-se a ligação entre o déficit de AGCC e a ocorrência de várias doenças, bem como os efeitos curativos das microbactérias probióticas, que são capazes de contrariar o déficit de AGCC.

Ácido acético: Regulação do metabolismo lipídico e do peso corporal.

As nove estirpes de probióticos testadas conseguiram secretar ácido acético [2].

Ácido propiónico: Melhoramento da função de barreira e da integridade intestinal, da homeostase da glicose e dos lípidos.

Tab. 1. Vista geral das propriedades in vitro de cada estirpe microbiana

Estirpe bacteriana	Sobre-vivência no fluido intestinal	Ligação a mucinas (aeróbia)	Ligação a mucinas (anaeróbia)	Produção de β-galactosidase	Produção de catalase e de superóxido dismutase	Produção de riboflavina	Produção de AGCC: ácido acético	Produção de AGCC: ácido propiónico	Produção de AGCC: ácido butírico
<i>Bacillus clausii</i> NR	+ ¹	+	+	+	+ ⁴	+	+	+ ⁶	+
<i>Bacillus clausii</i> OC	+ ¹	+	+	+	+ ⁴	+	+	+ ⁶	+
<i>Bacillus clausii</i> SIN	+ ¹	+	+	+	+	+	+	+ ⁶	+
<i>Bacillus clausii</i> T	+ ¹	+	+	+	+ ⁴	+	++ ⁵	++ ⁶	+
<i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050	+ ¹	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Bifidobacterium breve</i> DSM 16604	- ¹	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> DSM 17938	+ ¹	-	+	+	+	-	++ ⁵	-	+
<i>Lactiseibacillus rhamnosus</i> ATCC 53103	+ ¹	- ²	- ²	- ³	+	+	+	-	-
<i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM 1-745	+ ¹	+	-	- ³	+	-	+	+ ⁶	+

¹ As estirpes bacterianas *B. clausii* NR, OC, SIN e T, bem como *B. coagulans*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* e *S. cerevisiae* sobreviveram em condições intestinais simuladas até 480 minutos, ao passo que, no caso de *B. breve*, não foram detetadas células vivas 6 horas depois.

² *L. rhamnosus* não se conseguiu ligar a mucinas em condições aeróbias e anaeróbias ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respetivamente).

³ *L. rhamnosus* e *S. boulardii* não produziram β-galactosidase.

⁴ *B. clausii* OC apresentou uma maior atividade de SOD do que NR e T ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respetivamente).

⁵ *B. clausii* T e *L. reuteri* foram as produtoras mais fortes de ácido acético.

⁶ *B. clausii* T produziu as maiores concentrações de ácido propiónico, o que diferiu significativamente de *B. clausii* NR ($p = 0,0374$), *B. clausii* SIN ($p = 0,0112$) e *S. boulardii* ($p = 0,0007$).

As quatro estirpes *B. clausii* e *S. boulardii*, secretaram ácido propiónico. *B. coagulans*, *B. breve*, *L. reuteri* e *L. rhamnosus* não secretaram ácido propiónico [2].

Ácido butírico: Melhoramento da função de barreira e da integridade intestinal, fonte de energia para as células epiteliais intestinais.

As quatro estirpes *B. clausii* mostraram uma secreção comparável, superior à da *L. reuteri* e da *S. boulardii* [2].

Resumo

Um conhecimento mais profundo dos mecanismos probióticos pode permitir uma aplicação mais seletiva de tratamentos à base da microbiota para os pacientes. Estudos futuros com

base nisto podem esclarecer que outras potenciais áreas terapêuticas podem ser exploradas em prol dos pacientes.

Bibliografia

1. Mazzantini D, Calvigioni M, Celandroni F, Lupetti A, Ghelardi E. In vitro assessment of probiotic attributes for strains contained in commercial formulations. *Sci Rep.* 2022 Dec 14;12(1):21640. doi: 10.1038/s41598-022-25688-z. PMID: 36517529; PMCID: PMC9751119.
2. Calvigioni M, Bertolini A, Codini S, Mazzantini D, Panattoni A, Massimino M, Celandroni F, Zucchi R, Saba A, Ghelardi E. HPLC-MS-MS quantification of short-chain fatty acids actively secreted by probiotic strains. *Front Microbiol.* 2023 Mar 3;14:1124144. doi: 10.3389/fmicb.2023.1124144. PMID: 36937254; PMCID: PMC10020375.

Conflito de interesses: P. Pellegrino, M. C. Uboldi e M. III Perez são funcionários da Sanofi. D. Marquez era funcionário da Sanofi no momento do envio; no momento da recepção e da publicação, era funcionário da Boehringer Ingelheim.

Divulgação: Texto e publicação médica financiados por Sanofi.

Informações sobre o manuscrito:

Data de entrega: 21.09.2023

Data de aprovação: 09.02.2024

Data de publicação: 11.03.2024