

ARTIGO DE REVISÃO

Microbiota intestinal e probióticos: Implicações sobre o câncer de cólon

Autores: R. Bedani, E.A. Rossi

Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil

RESUMO | Atualmente, muito tem se discutido sobre o papel da microbiota intestinal, em particular das bactérias colônicas, na etiologia do câncer de cólon. Evidências revelam que uma microbiota desequilibrada pode contribuir para o desenvolvimento dessa doença. No entanto, estudos têm mostrado que os probióticos podem modular benéficamente a microbiota intestinal do hospedeiro, contribuindo para a inibição da carcinogênese. O presente trabalho tem como propósito apresentar uma revisão sobre a microbiota intestinal e sua relação com a promoção do câncer de cólon, bem como relatar, baseado em evidências científicas, os efeitos benéficos do consumo de probióticos e os possíveis mecanismos pelos quais esses microrganismos poderiam inibir o desenvolvimento desse tipo de câncer.

Palavras-chave: Câncer de cólon; microbiota intestinal; probióticos.

SUMMARY | Recently, the role of intestinal microbiota, particularly colonic bacteria, in colon cancer etiology has been widely discussed in scientific literature. Evidence indicate that unbalanced microbiota could contribute to the development of this disease. However, studies have showed that probiotics beneficially modulate intestinal microbiota of host which contributes to an inhibition of carcinogenesis. We review the role of intestinal microbiota on colon cancer promotion, as well as, the potential benefits of probiotics intake in preventing colon cancer and the possible mechanisms involved.

Keywords: Colon cancer; intestinal microbiota; probiotics.

GE - J Port Gastroenterol 2009; 15: 19-28

Recebido para publicação: 06/10/2008

Aceite para publicação: 11/11/2008

INTRODUÇÃO

Atualmente, o setor de alimentos vem investindo no desenvolvimento dos alimentos funcionais. Um exemplo de alimento funcional que tem sido foco de intensas pesquisas, nos recentes anos, refere-se aos produtos processados com probióticos.

Dentre os potenciais efeitos protetores dos probióticos, pode-se destacar a inibição do desenvolvimento do câncer de cólon, enfermidade muito relacionada ao padrão alimentar dos indivíduos. Acredita-se que o alto consumo de gordura associada à carne vermelha e ao baixo consumo de fibras, padrão alimentar muito característico de países ocidentais, possam contribuir para o aumento do risco desse tipo de câncer. Além disso, a microbiota intestinal parece desempenhar um papel importante na etiologia da doença.

Várias são as evidências, a partir de estudos *in vitro* e *in vivo*, que indicam que os probióticos são capazes de modular benéficamente a microbiota intestinal e contribuir para a prevenção do câncer de cólon. Desta forma, esse trabalho tem como objetivo apresentar uma revisão sobre o papel da microbiota intestinal e dos probióticos na prevenção do câncer de cólon, bem como apontar os principais mecanismos de ação envolvidos nessa prevenção.

Câncer de cólon

O câncer de cólon está entre as principais enfermi-

dades do mundo ocidental. A cada ano cerca de um milhão de pessoas são diagnosticadas com essa doença, sendo que aproximadamente 500 mil morrem devido a complicações ^[1]. Só no Brasil, estimativas de incidência apontam o câncer colo-retal (CCR) como o quarto tumor maligno mais freqüente em homens (12.490 casos novos) e o terceiro entre as mulheres (14.500 casos novos). A prevalência de casos ocorre na faixa etária entre 50 e 70 anos, mas as possibilidades de desenvolvimento aumentam a partir dos 40 anos ^[2].

A maioria dos casos ocorre esporadicamente sendo o tipo mais comum o adenocarcinoma, que se desenvolve a partir de células glandulares que cobrem a parede do intestino ^[3]. Os tumores aumentam a partir do epitélio normal através de um acúmulo de mutações somáticas seguidas de uma seleção clonal que resulta na transformação maligna ^[4]. A instabilidade genômica é fundamental para esse processo e está relacionada ao rearranjo de genes, perdas e ganhos de fragmentos de DNA, aneuploidias e perda de heterozigose ^[4]. Além disso, há inativação de genes supressores de tumor, tais como *APC*, *DCC*, *DPC4* e *p53*, juntamente com a ativação de oncogenes, dos quais a família dos genes ras são, atualmente, os mais bem descritos ^[3].

Geralmente, o tumor de cólon é detectado pela primeira vez como um pólipó, embora atualmente seja possível se detectar pequenas lesões afetando as criptas, chamadas de focus de criptas aberrantes (FCA) ^[3], a partir das quais os adenomas e carcinomas podem se desenvolver no cólon. Tais focus podem funcionar como um marcador pré-neoplásico no processo de carcinogênese ^[5]. Os tumores podem aparecer em qualquer lugar no cólon, embora a maioria dos CCR esporádicos esteja localizada no lado esquerdo do cólon distal (incluindo o reto e o sigmóide e o cólon descendente) ^[6].

Por outro lado, tem-se mostrado que populações imigrantes podem apresen-

tar risco de câncer da área para qual migraram, sugerindo que o ambiente pode apresentar um papel importante no desenvolvimento do câncer colo-retal ^[7]. Estudos epidemiológicos têm apontado para o risco do alto consumo de gordura, carne vermelha e baixo consumo de fibras, típicos de uma dieta ocidental, na etiologia desse tipo de câncer ^[8]. Um dos possíveis efeitos de uma dieta ocidental sobre o câncer de cólon relaciona-se ao aumento da excreção de ácidos biliares secundários (litocólico e desoxicólico) ^[9]. Além disso, a produção de amônia aumentada em ratos que consomem uma dieta rica em proteína também tem sido relacionada ao aumento do risco desse tipo de câncer em modelos animais ^[10]. No entanto, o alto consumo de frutas, cereais, peixe e cálcio podem ser relacionados a um risco reduzido no desenvolvimento do câncer de cólon ^[11].

Vale ressaltar que a microbiota colônica tem sido implicada na etiologia dessa doença, embora nenhum estudo tenha definido convincentemente quais bactérias ou quais mecanismos estão envolvidos na promoção do tumor ^[12]. O efeito da dieta sobre a carcinogênese pode ser mediado pela mudança da atividade metabólica e composição da microbiota colônica ^[11].

Estudos têm apontado para o papel da inflamação na patogênese do CCR, indicando que as bactérias colônicas comensais influenciam esse processo ^[13]. A ampla variedade de bactérias no intestino produz diferentes metabólitos que modulam o desenvolvimento normal e funcional do hospedeiro. Atividades metabólicas da microbiota colônica podem gerar compostos prejudiciais ao hospedeiro como os intermediários do oxigênio reativo. Essas moléculas, que incluem superóxido, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso, oxigênio singlete e o radical hidroxil, provocam o dano oxidativo do DNA celular e aumentam o risco do câncer de cólon ^[14]. Estudos revelaram que o *Enterococcus faecalis* comensal foi capaz de produzir superóxido e peróxido de hidrogênio, provocando danos ao DNA em células epiteliais colônicas, tanto em ensaios *in vitro*

quanto *in vivo* ^[1,15]. Dado o papel da microbiota intestinal na carcinogênese colônica, sugere-se que fatores que modulem a composição e ou a atividade da microbiota possam inibir o desenvolvimento do CCR.

Microbiota intestinal

Por muito tempo, a terminologia usada para se referir à comunidade de microrganismos presentes nos intestinos foi microflora intestinal, ou apenas flora. No entanto, esse termo significa pequenas plantas e, taxonomicamente, não está de acordo com a classificação de bactérias, fungos, vírus e protozoários. Portanto, tem se recomendado o uso do termo microbiota intestinal para se designar o conjunto de microrganismos presentes nos intestinos ^[16]. Além disso, estudos indicam que a microbiota intestinal se trata de uma mistura dinâmica de microrganismos, cuja composição varia ao longo do trato gastrointestinal (TGI) e entre a mucosa e o lúmen intestinal. A microbiota se desenvolve a todo momento, decorrente da interação de fatores genéticos, contato com o ambiente, dieta e doença, explicando o fato de que cada indivíduo apresente uma microbiota única ^[17].

A maior concentração de microrganismos e atividade metabólica é encontrada no intestino grosso, sendo que a partir do íleo a concentração de bactérias aumenta gradualmente, alcançando 10^{11} a 10^{12} UFC/g no cólon ^[16]. A microbiota, adulta e estável, é composta por espécies autóctones (membros permanentes) e alóctones (membros transitórios que são adquiridos de uma origem externa). A microbiota é diversa, composta de 400 a 1000 espécies, sendo que mais de 60% delas não são cultiváveis fora do ambiente intestinal ^[18]. Todavia, estima-se que 30 a 40 espécies predominem nesse ecossistema. Além disso, a maioria das espécies de bactérias é anaeróbia estrita (97%), ao passo que apenas 3% são aeróbias (anaeróbias facultativas). Os gêneros anaeróbios mais comuns são: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium* e *Lactobacillus*. Entre os aeróbios encontramos as bactérias entéricas Gram

negativas (*E. coli* e *Salmonella* spp) e os cocos Gram positivos (*Enterococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*). Espécies de fungos, tais como *Candida albicans*, também fazem parte da microbiota normal^[18]. Alguns desses gêneros são benéficos ao hospedeiro, tais como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, no entanto, outros podem ser potencialmente patogênicos^[19].

A grande diversidade da microbiota intestinal pode ser explicada pelo grande número de substratos fermentáveis disponíveis, provenientes, por exemplo, da dieta^[20]. A fermentação de polímeros complexos, tais como polissacarídeos e proteínas, no cólon necessitam da ação de diferentes grupos de microrganismos. Os principais produtos da fermentação bacteriana no cólon são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)^[21]. A produção de gases como hidrogênio e gás carbônico, também ocorre no ambiente colônico^[20]. Além disso, intermediários da fermentação [etanol, lactato, succinato, piruvato e formato] são produzidos e podem ser metabolizados a ácidos graxos de cadeia curta, CO₂ e H₂^[22]. Espécies proteolíticas podem produzir, além dos AGCC, produtos finais como amônia, fenol, indol, aminas, H₂S e mercaptanos. Além disso, a metabolização de aminoácidos pode gerar ácidos graxos de cadeia ramificada como o isobutirato e isovalerato^[23]. A maioria dos estudos da microbiota intestinal faz uso de métodos convencionais dependentes de cultivo em meios seletivos. Entre os fatores limitantes desses métodos podem-se citar a baixa sensibilidade, baixa reprodutibilidade, longo tempo consumido para as análises e recuperação apenas de espécies cultiváveis^[24]. Como resultado, pode ocorrer a superestimação ou subestimação da quantidade de algumas espécies presentes no meio^[25].

Recentemente, o uso da biologia molecular tem contribuído para a aplicação de métodos rápidos e independentes de cultivo. Em particular, métodos utilizando regiões do 16S rRNA (16S ribosomal RNA) têm demonstrado sucesso em se caracte-

terizar a microbiota intestinal, permitindo a enumeração de microrganismos não-cultiváveis por técnicas convencionais de cultivo ou que morreram durante transporte e estocagem do material^[26]. No entanto, outros investigadores concluíram que a identificação de espécies com base apenas em dados da sequência de genes do 16S rRNA não é suficiente. Nesse sentido, há uma tendência para o uso de regiões consideradas mais variáveis entre as espécies, como é o caso da região espaçadora 16S-23S rRNA^[27].

O FISH (*fluorescent in situ hybridization*), método baseado na reação de polimerase em cadeia (PCR), utiliza sondas de oligonucleotídeos (15-25 pares de bases) ligadas a um componente fluorescente que hibridizam regiões específicas do 16S rRNA, podendo ser evidenciadas pela fluorescência^[28]. A enumeração desses microrganismos fluorescentes pode ser feita microscopicamente pela contagem visual ou por análise de imagem. Em caso de muitas amostras, a citometria de fluxo pode permitir a análise desse material. Esse método está sendo usado para o estudo da composição bacteriana do TGI, e sondas têm sido desenvolvidas para a quantificação dos seguintes gêneros: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Collinsella*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Veillonella*, *Fibrobacter* e *Ruminococcus*^[17]. Entretanto, o FISH quando usado isoladamente não fornece informações sobre a função metabólica dos microrganismos^[29].

Os estudos de caracterização da microbiota intestinal não são as únicas fontes de informação sobre o ecossistema intestinal. É necessário que se some a esses estudos a determinação da interação entre os microrganismos, bem como a interação entre microrganismos e o hospedeiro.

Funções da microbiota intestinal

A alta atividade metabólica e endócrina do TGI, além do seu papel nutricional, resulta num importante impacto sobre a saúde e o bem-estar do indivíduo. As

bactérias colônicas já são consideradas como as maiores determinantes da saúde e doença. Tem se tornado cada vez maior o interesse em manipular populações bacterianas intestinais que possam melhorar a saúde do hospedeiro^[30].

Uma das funções primárias da microbiota intestinal é o aproveitamento de energia a partir de elementos da dieta que poderiam ser perdidos pela excreção^[31]. Os polissacarídeos não digeridos no cólon são metabolizados por microrganismos residentes a ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), tais como butirato, propionato, os quais são absorvidos por difusão passiva^[32]. A produção de AGCC é dependente dos substratos disponíveis. O amido, por exemplo, é altamente butiragênico enquanto que a fermentação de outros polissacarídeos resulta na produção de acetato e propionato^[32]. As concentrações de AGCC são maiores no lado direito do cólon comparado ao esquerdo e isso é provavelmente devido à maior disponibilidade de carboidratos^[33]. Os AGCC apresentam um importante papel na manutenção da camada epitelial. Estudos mostram que as células epiteliais colônicas adquirem cerca de 70% de sua energia a partir da oxidação do butirato^[31]. O butirato também atua como um fator trófico para células em tecidos intactos^[34]. Além disso, tem sido proposto que o butirato reduz o risco de câncer de cólon devido a sua habilidade em inibir a atividade genotóxica das nitrosaminas e do peróxido de hidrogênio, bem como de induzir diferentes níveis de apoptose, diferenciação e parada do ciclo celular no câncer de cólon em modelos animais^[3,35]. Outros investigadores citam ainda o efeito do butirato sobre os mediadores da inflamação. Já se mostrou que o butirato é capaz de inibir a expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β) a partir da inibição da ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B)^[36]. Diversos são os estudos que tentam estabelecer relações entre bactérias e o câncer de cólon. Já se sabe que diversos metabólitos bacterianos são carcinogênicos, como por exemplo, os fecapentanos, as nitrosaminas, o fenol, o indol, as aminas, a amônia, entre

outros^[30]. Desta forma, o grande interesse por probióticos aumenta a partir da possibilidade de se modular benéficamente a microbiota intestinal no sentido de diminuir bactérias associadas a doenças colônicas.

Probióticos e o câncer de cólon

A FAO/WHO refere-se aos probióticos como sendo microrganismos vivos que, quando administrados em doses adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro^[37]. Os efeitos benéficos trazidos pela ingestão de probióticos incluem: alívio dos sintomas causados pela intolerância à lactose, tratamento de diarreias, redução do colesterol sérico, aumento da resposta imune, efeitos anticarcinogênicos, entre outros^[38]. Atualmente, o maior consumo de produtos probióticos por humanos na Europa é na forma de produtos lácteos contendo, na maioria das vezes, *Lactobacillus* e ou *Bifidobacterium*. Entretanto, encontram-se produtos em que os microrganismos utilizados são estirpes do *Enterococcus* ou leveduras tais como o *Saccharomyces boulardii*^[39]. Alimentos para o consumo humano contendo bactérias ácido-láticas incluem os leites fermentados, sucos de frutas, vinhos e salsichas. Culturas simples ou mistas de microrganismos vivos são usadas nas preparações probióticas^[26,40].

Várias observações experimentais têm apontado para o potencial efeito protetor das bactérias ácido-láticas (BALs) contra o desenvolvimento de tumores no cólon^[41]. Dentro da complexa microbiota intestinal, as BALs são parte daquelas bactérias capazes de promover efeito benéfico. Elas apresentam um papel importante no retardamento da carcinogênese do cólon pela possibilidade de influenciar funções metabólicas, imunológicas e protetoras nesse seguimento do intestino^[35].

Prováveis mecanismos de ação dos probióticos

Muito se tem discutido sobre qual etapa do processo de carcinogênese os probióticos

podem exercer seus efeitos. É provável que diferentes cepas probióticas possam atuar em diferentes estágios da carcinogênese. Em geral, os probióticos não colonizam o trato intestinal humano permanentemente, mas algumas cepas são capazes de colonizar transitoriamente e modular a microbiota indígena^[25].

Os mecanismos pelos quais as BALs podem inibir o câncer de cólon ainda não estão bem elucidados. No entanto, tais mecanismos podem incluir: alteração da atividade metabólica da microbiota intestinal; alterações das condições fisiológicas do cólon; ligação e ou degradação de carcinógenos potenciais; alterações qualitativas e quantitativas da microbiota intestinal; alterações das condições físico-químicas do cólon; efeitos na fisiologia do hospedeiro^[42]. Tem sido proposto que os probióticos podem modular as atividades metabólicas da microbiota intestinal competindo por nutrientes; produzindo agentes antibacterianos, tais como bacteriocinas, que podem inibir o crescimento de outros membros da microbiota intestinal; produzindo ácidos orgânicos, que reduzem o pH luminal e modulando a atividade enzimática^[8].

Várias investigações têm mostrado a influência do consumo dos probióticos sobre a atividade de enzimas bacterianas relacionadas à produção de compostos carcinogênicos. O efeito carcinogênico é provavelmente influenciado pela atividade de das enzimas β -glucuronidase, nitrorredutase e azorredutase^[43,44].

A β -glucuronidase bacteriana parece desempenhar um papel importante na iniciação do câncer de cólon, devido à capacidade de hidrolisar vários glucuronídeos e liberar agliconas carcinogênicas no lúmen intestinal^[45,46]. A nitrorredutase e azorredutase estão relacionadas à formação de aminas aromáticas nocivas ao organismo^[47]. Marteau et al.^[48] verificaram a capacidade do leite fermentado contendo *L. acidophilus* A1, *B. bifidum* B1, *Streptococcus lactis* e *S. cremoris* em modificar as atividades metabólicas da microbiota colônica em huma-

nos. Nove indivíduos que consumiram 100g do produto três vezes ao dia, por três semanas, mostraram redução das concentrações fecais de nitrorredutase, azorredutase e β -glucuronidase em relação ao período controle, em que eles consumiram leite não fermentado.

Bactérias benéficas e prejudiciais são comumente encontradas no intestino e diferem em suas atividades enzimáticas^[49]. As bactérias dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* apresentam uma baixa atividade das enzimas que convertem procarcinógenos em carcinógenos se comparada com bactérias dos gêneros *Bacteroides* e *Clostridium*^[50]. Em vista disso, os efeitos já observados sobre as atividades de enzimas fecais podem ser devido à redução no número de microrganismos produtores de enzimas procarcinogênicas^[51].

Goldin e Gorbach estudaram o efeito da ingestão de *L. acidophilus* em ratos alimentados com uma dieta à base de carne. Eles verificaram que os animais que consumiram essa BAL apresentaram uma menor atividade das enzimas fecais nitrorredutase e azorredutase^[52]. Num estudo preliminar mais recente, Haber et al. verificaram que animais também alimentados com uma dieta à base de carne e gordura apresentaram uma redução da atividade da β -glucuronidase e azorredutase após o consumo de cepas de *Lactobacillus* (*L. johnsonii* e *L. reuteri*) por um período de 5 semanas^[54]. Goldin e Gorbach estudaram, em humanos, o efeito da ingestão de *L. acidophilus*, cepas NCFM e N-2, sobre a atividade da β -glucuronidase, nitrorredutase e azorredutase. Ambas as cepas tiveram um efeito similar e causaram um declínio significativo na atividade das três enzimas estudadas. Um efeito reverso foi encontrado 10 a 30 dias após o término da ingestão dessa bactéria, sugerindo que o consumo contínuo de *L. acidophilus* é necessário para se manter o efeito desejado^[43].

Benno e Mitsuoka^[54] e Spanhaak et al.^[44] também verificaram, em humanos, uma redução significativa na atividade da β -glucuronidase após a ingestão de

Bifidobacterium longum e de *Lactobacillus casei* Shirota, respectivamente. Resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa em associação com o Centro de Referência para Lactobacilos (CERELA, Argentina) mostraram que a ingestão de iogurte de soja fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 (microrganismo probiótico) levou à redução da atividade das enzimas azorredutase e nitrorredutase em camundongos alimentados com uma dieta à base de carne bovina.*

Os metabólitos fecais também são indicadores da atividade bacteriana. A amônia é considerada um promotor em potencial de tumor no cólon, e sugere-se que ela aumenta a transformação neoplásica no intestino. Mudanças nas atividades enzimáticas e na concentração de amônia, fenol e cresol têm sido detectadas em voluntários que consumiram lactobacilos^[43]. Outros produtos com possíveis efeitos adversos são os compostos N-nitroso, diacilglicerol e ácidos biliares secundários^[41].

Segundo Benno e Mitsuoka, uma ampla variedade de microrganismos produzem amônia como, por exemplo, enterobactérias, bacteróides e clostrídeos. Esses mesmos autores sugerem que uma redução da proporção de clostrídeos e bacteróides pode causar a redução da concentração de amônia fecal em indivíduos que consumiram *Bifidobacterium longum*^[54].

Estudos epidemiológicos indicam uma associação entre o risco do desenvolvimento do câncer de cólon e o consumo de dietas ricas em gordura. Para a digestão das gorduras, os ácidos biliares conjugados a moléculas de taurina ou glicina são liberados no intestino delgado e reabsorvidos nesse local. No entanto, uma parte pode passar para o cólon, podendo ser metabolizada por bactérias. Os ácidos biliares são inicialmente desconjugados no cólon e sofrem reação de dehidroxilação do grupo 7 α -hidroxil, formando os ácidos desoxicólico e litocólico. Acredita-se que esses ácidos possam exercer efeito citotóxico sobre as células epiteliais, podendo conduzir ao desenvolvimento do câncer de cólon^[55]. Ling *et al.*^[51] estudaram os efei-

tos da ingestão de iogurte contendo *Lactobacillus* GG e ou suplemento de fibras sobre a atividade de diversas enzimas (β -glucuronidase, nitrorredutase, β -glucosidase, hidrolase de sais biliares e urease) em 64 mulheres. Eles verificaram que o consumo desse produto diminuiu significativamente as atividades da β -glucuronidase, nitrorredutase e hidrolase de sais biliares. Lidbeck *et al.* verificaram que a administração por 6 semanas de *L. acidophilus* a pacientes com câncer de cólon resultou em redução na concentração de ácidos biliares solúveis nas fezes^[46].

O consumo de leite fermentado contendo *L. acidophilus* pode reduzir a contagem de bactérias putrefativas, tais como coliformes, e aumentar os níveis de lactobacilos no intestino^[56], sugerindo que a suplementação com esse microrganismo pode representar um efeito benéfico uma vez que inibe o crescimento de bactérias putrefativas que estão possivelmente envolvidas na produção de promotores de tumores e pré-carcinógenos. Em estudo recente, nosso grupo de pesquisa mostrou que a ingestão de iogurte de soja fermentado com *E. faecium* CRL 183 é capaz de alterar a microbiota fecal de ratos alimentados com ração a base de carne, levando a um aumento do número de bactérias do gênero *Lactobacillus* e uma redução do gênero *Bacteroides*.*

Nem todos os estudos mostram uma correlação entre a administração de probióticos e a atividade da microbiota intestinal. Bartram *et al.* discutem que a microbiota fecal é relativamente estável e geralmente não afetada pela administração de probióticos. Num estudo de intervenção, 12 indivíduos consumiram iogurte (500 mL) enriquecido com *Bifidobacterium longum*^[57]. Nenhuma diferença significativa foi encontrada quanto a peso fecal, pH, concentração fecal de ácidos graxos de cadeia curta, ácidos biliares e esteróis neutros após 3 semanas de intervenção. Embora tivesse ocorrido um aumento na concentração fecal de *B. longum*, os resultados sugerem uma pequena ou nenhuma modulação da mi-

crobiota residente. Alguns investigadores têm sugerido que um elevado pH intestinal pode estar relacionado ao aumento do risco de câncer de cólon, enquanto a acidificação do cólon poderia prevenir a formação de carcinógenos. Benno e Mitsuoka verificaram uma redução significativa do pH fecal após 5 semanas de administração de *Bifidobacterium longum* em homens saudáveis^[54].

Evidências indicam que uma elevada concentração de ácidos graxos de cadeia curta auxilia na manutenção de um pH apropriado no lúmen do cólon, que é importante para a expressão de muitas enzimas bacterianas sobre compostos estranhos e sobre o metabolismo dos carcinógenos no intestino^[5,58]. A atividade de alguns carcinógenos da dieta como, por exemplo, as nitrosaminas (resultante da atividade metabólica de bactérias comensais em indivíduos que consomem uma dieta rica em proteínas) é neutralizada pelo ácido butírico produzido por alguns probióticos^[35]. Além das nitrosaminas, a produção de amônia e ácidos biliares secundários no ambiente intestinal pode ser reduzida pela acidificação do pH^[59].

Um estudo descritivo em humanos comparou a composição da microbiota fecal de pessoas com diferentes riscos de câncer de cólon. Um alto risco foi associado à presença de *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides stercoris* e, surpreendentemente, de *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium angulatum*. No entanto, um baixo risco foi relacionado à presença de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus* S06 e *Eubacterium aerofaciens*^[60].

Estudos revelam que as BALs estão envolvidas na detoxificação de vários carcinógenos tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e aminas aromáticas heterocíclicas^[61]. Os mecanismos de ação dessas bactérias ainda são pouco conhecidos, mas é possível que as BALs liguem-se diretamente ao carcinógeno e inibam seu efeito; catalisem reações de

* Resultados em fase de publicação

detoxificação e produzam metabólitos que podem ser utilizados no processo de detoxificação do carcinógeno ^[42]. Vale destacar que os efeitos protetores conferidos pelas BALs são apenas demonstrados quando essas se encontram em alta concentração (10⁹ UFC). Além disso, a ingestão regular é necessária para manter uma população benéfica suficiente ^[62].

Morotomi e Mutai investigaram a habilidade de 22 cepas de bactérias intestinais de se ligarem a pirrolizatos mutagênicos e compararam esta habilidade a dietas com fibras. A 3-amina-1,4-dimetil-5H-pirido (Trp-P-1) indol e 3-amina-1-metil-5H-pirido (Trp-P-2) indol foram efetivamente ligadas a todas as bactérias Gram positivas e a algumas Gram negativas ^[63]. Quando o mecanismo de ligação do Trp-P-2 ao *L. casei* YIT 9018 foi investigado, ele se mostrou dependente do pH, sendo inibido imediatamente pela adição de sais metálicos. No entanto, pouco se sabe sobre esses mecanismos no trato gastrointestinal de humanos. Evidências *in vivo* de que os probióticos se ligam a carcinógenos são ainda pouco conclusivas. Nessa linha, estudos com humanos que receberam probióticos mostraram que esses indivíduos apresentaram uma diminuição na quantidade de mutagênicos na urina, sugerindo que esses compostos não seriam absorvidos a partir do intestino e que os probióticos estariam envolvidos em sua degradação ^[64]. Diversos estudos também têm verificado o efeito dos probióticos sobre a fase de promoção da carcinogênese. Em estudo realizado por Rowland *et al.* foi verificado que a administração de *Bifidobacterium longum* 25 inibiu a formação de focus de criptas aberrantes em ratos que receberam indutor de carcinogênese (azometano) ^[65]. Vale ressaltar que esse efeito foi aumentado quando se associou ao probiótico o probiótico inulina. Além disso, foi verificada redução na concentração de amônia fecal.

tumores colônicos em ratos que consumiram *Lactobacillus* GG antes, durante e depois da exposição à dimetilhidrazina se comparado com os animais que receberam o probiótico após as injeções de carcinógeno ^[66]. Os investigadores concluíram que os probióticos agiram inibindo a iniciação ou a fase de promoção inicial da carcinogênese. Recentemente, estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram a influência do *Enterococcus faecium* CRL 183 na formação focus de criptas aberrantes e no desenvolvimento do câncer de cólon induzido pelo 1,2 dimetilhidrazina em ratos. Os resultados evidenciaram que esse microrganismo foi capaz de reduzir a progressão do tumor pela modulação da resposta imune ^[67]. Diversos são os estudos que correlacionam o efeito dos probióticos com o sistema imune. As evidências *in vitro*, em modelos animais e em humanos sugerem que os probióticos podem estimular tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa ^[5].

As células epiteliais intestinais estão em contato direto com a microbiota intestinal luminal e com o sistema imune. Bactérias intestinais podem se ligar a receptores localizados na superfície de células epiteliais e desencadear uma cascata de mecanismos de defesa imunológica, tais como a produção de citocinas pró e anti-inflamatória. Acredita-se que os probióticos possam modular a resposta imunológica inata tanto na direção pró-inflamatória como anti-inflamatória ^[68]. Os efeitos positivos dos probióticos sobre o sistema imunológico ocorrem sem o desencadeamento de uma resposta inflamatória prejudicial ^[5].

Os avanços recentes sobre o entendimento da atividade imunomodulatória dos probióticos têm sido alcançados a partir da descoberta dos receptores de reconhecimento padrão *Toll-like* (TLRs). Eles são proteínas transmembrana presentes na superfície de células como, por exemplo, macrófagos, monócitos, células dendríticas e células epiteliais. O sistema imunológico inato reconhece um grande número de estruturas moleculares de

bactérias, como, por exemplo, lipopolissacarídeos e ácidos lipoteicóicos, e é capaz de distinguir se um determinado microrganismo faz parte de sua microbiota ou não. Diferentes estruturas ativam diferentes TLRs ^[69]. Por exemplo, o TLR-2 reconhece os peptídeoglicos e ácido lipoteicóico que são componentes de parede de bactérias Gram positivas como os lactobacilos e bifidobactérias ^[70]. Já o TLR-4 é o maior receptor de lipopolissacarídeos, principal componente da parede de bactérias Gram negativas ^[71].

A ligação de componentes dos microrganismos com esses receptores pode levar a uma cascata de reações inflamatórias através da ativação do fator nuclear kB (NF-kB), com subsequente liberação de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, mediadores lipídicos e espécies de oxigênio e nitrogênio reativas ^[72]. Estudos têm mostrado que os probióticos podem ativar elementos responsáveis pela formação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, embora essa resposta tenha sido mais fraca em *L. rhamnosus* se comparada com a de um patógeno Gram positivo (*Streptococcus pyogenes*) ^[73]. Alguns autores têm sugerido que um possível mecanismo de ação dos probióticos seria a inibição da ativação do NF-kB reduzindo a inflamação intestinal ^[74]. No entanto, os mecanismos potenciais dos probióticos contra a carcinogênese, no que se refere à modulação do sistema imune, são complexos e precisam ser melhor elucidados.

Uma resposta imune inflamatória produz monócitos e macrófagos ativados por citocinas que liberam moléculas citotóxicas capazes de lisar células de tumores *in vitro* ^[75]. As citocinas IL-1 inflamatória e TNF- α (fator de necrose tumoral) exercem efeitos citotóxicos e citostático sobre células neoplásicas em modelos *in vitro* ^[76]. Células *natural-killer* (NK) são efetivas contra células tumorais e a baixa atividade desse tipo celular tem sido associada ao risco de câncer ^[77]. Matsuzaki e Chin verificaram atividade de células NK e respostas inflamatórias aumentadas com a

administração de cepas probióticas ^[78].

Vários estudos em humanos revelaram um aumento de células NK em resposta ao consumo de probióticos. ^[79,80] Em modelos animais esse efeito também foi observado. Takagi *et al.* ^[81], utilizando a cepa *L. casei*. Shirota com o intuito de inibir o desenvolvimento de tumor induzido por *methylcholanthrene* em camundongos, verificaram níveis elevados de células NK no grupo tratado com o probiótico, o que retardou o início do desenvolvimento do tumor se comparado ao grupo controle.

Berman *et al.* não verificaram aumento das células NK em indivíduos saudáveis que consumiram durante 8 semanas uma formulação contendo 4 espécies de probióticos (*L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. salivarius* e *B. bifidum*) ^[82]. No entanto, os investigadores puderam verificar um aumento da fagocitose realizada por neutrófilos e monócitos.

Evidências têm mostrado que o probiótico *L. casei* Shirota apresenta efeito anti-tumor e anti-metastático na carcinogênese de roedores (biológica ou quimicamente induzida). A administração intrapleural dessa cepa em camundongos com tumor induziu a produção de várias citocinas, tais como interferon- γ , IL-1 β e TNF- α na cavidade torácica, o que resultou na inibição do tumor e aumento da sobrevida ^[83]. Estudo utilizando *B. longum* e *B. animalis* mostrou que es-

sas bactérias induzem a produção de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α) ^[84].

Por outro lado, respostas de células T helper tipo 1 (Th-1) parecem conduzir a condições inflamatórias crônicas no cólon e isso pode estar associado ao risco de se desenvolver câncer de cólon ^[85]. Perdigón *et al.* ^[86] verificaram que alguns probióticos podem ativar uma resposta do tipo Th-2 secretória, o que pode levar à inibição da carcinogênese por mecanismos anti-inflamatórios.


Diferentes probióticos são capazes de induzir respostas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias ou secretórias que podem inibir a carcinogênese. No entanto, tais efeitos são considerados espécie e cepa dependentes.

CONCLUSÃO

A microbiota intestinal desempenha um importante papel na manutenção da saúde do hospedeiro. Evidências indicam que uma microbiota desequilibrada pode contribuir para o desenvolvimento de diversas doenças, como por exemplo, o câncer de cólon. Na literatura são encontrados inúmeros estudos, principalmente *in vitro* e experimentos com animais (roedores), relatando que certos probióticos apresentam efeitos anti-carcinogênicos. No entanto, tais efeitos ainda precisam de ser melhor elucidados. Vale ressaltar que há vários mecanismos que podem explicar como os probióticos protegem contra

o desenvolvimento do câncer, mas é importante considerar que diferentes cepas apresentam diferentes mecanismos de ação, sugerindo um efeito espécie/cepa específico. Além disso, é importante destacar que uma cepa probiótica pode não ser efetiva para todos os indivíduos ou para um mesmo indivíduo em diferentes fases da doença.

Embora os resultados das pesquisas voltadas para a prevenção do câncer de cólon sejam bastante promissores, ainda é prematuro recomendar o uso de probióticos contra essa doença, principalmente porque há um número limitado de trabalhos em humanos, tanto epidemiológicos quanto clínicos, que fornecem embasamento para tal recomendação. Vale aqui mencionar que a biologia molecular tem se tornado uma ferramenta importante para o entendimento não só dos mecanismos de ação dos probióticos, mas também da microecologia intestinal.

Desta forma, é de suma importância que novos trabalhos sejam realizados no sentido de se compreender melhor as interações entre microbiota intestinal, probióticos e hospedeiro e que produtos contendo tais microrganismos possam ser desenvolvidos com intuito de contribuir para o bem-estar do indivíduo, ou seja, promovendo a saúde do hospedeiro. 

Correspondência

Raquel Bedani

Departamento de Alimentos e Nutrição
Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Universidade Estadual Paulista
Rodovia Araraquara-Jaú km 1,
Campus Universitário, Caixa Postal 502
CEP 14801-902, Araraquara, Brasil.
Email: raquelbedani@yahoo.com.br
TEL: +55-16-33016922
FAX: +55-16-33016920

Bibliografia

1. Wang X, Huycke MM. Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* promotes chromosomal instability in mammalian cells. *Gastroenterology* 2007;132:551-561.
2. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2008: incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2007. ISBN 978-85-7318-126-5. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=tabelasestados.asp&UF=BR>. Acesso em: 04/01/2008.
3. Hope ME, Hold GL, Kain R, El-Omar EM. Sporadic colorectal cancer – role of the commensal microbiota. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 244:1-7.
4. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Genomic Metastasis Rev* 2004;23:11-27.
5. Saad SM. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Res Bras Ciênc Farm* 2006;42:1-16.
6. Rabeneck L, Davila JA, El-Serag HB. Is there a true "shift" to the right colon the incidence of colorectal cancer?

- Am J Gastroenterol 2003;98:1400-1409.
7. Maskarinec G, Noh JJ. The effect of migration on cancer incidence among Japanese in Hawaii. *Ethn Dis* 2004; 14:431-439.
 8. Commane D, Hughes R, Shortt C, Rowland I. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutat Res* 2005;591:276-289.
 9. Bartram HP, Scheppach W, Schmid H, et al. Proliferation of human colonic mucosa as an intermediate biomarker of carcinogenesis: effects of butyrate, deoxycholate, calcium, ammonia, and pH. *Cancer Res* 1993;53:3283-3288.
 10. Macbain AJ, Macfarlane GT. Ecological and physiological studies on large intestinal bacteria in relation to production of hydrolytic and reductive enzymes involved in formation of genotoxic metabolites. *J Med Microbiol* 1998;47: 407-416.
 11. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003;361:512-519.
 12. Macgarr SE, Ridlon JM, Hylemon PB. Diet, anaerobic bacterial metabolism, and colon cancer: a review of the literature. *J Clin Gastroenterol* 2005;39:98-109.
 13. Cebra JJ. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am J Clin Nutr* 1999;69:1046S-1051S.
 14. Owen RW, Spiegelhalter B, Bartsch H. Generation of reactive oxygen species by the faecal matrix. *Gut* 2000;46:225-232.
 15. Huycke MM, Abrams V, Moore DR. *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis* 2002;23:529-536.
 16. Isolauri E, Salminen S, Ouwehand A. Probiotic. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:299-313.
 17. Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr* 2004;134:465-472.
 18. Noverr MC, Huffnagle GB. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? *Trends Microbiol* 2004;12:562-568.
 19. Boulioux P, Koletzko B, Guarne F, Braesco V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The intelligent Intestine," held in Paris, June 14, 2002. *Am J Clin Nutr* 2003;78:675-678.
 20. Blaut M, Clavel T. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *J Nutr* 2007;137:751S-755S.
 21. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995;125:1401-1412.
 22. Turton LJ, Drucker DB, Ganguli LA. Effect of glucose concentration in growth medium upon neutral and acidic fermentation end-products of *Clostridium bifermens*, *Clostridium sporogenes* and *Peptostreptococcus anaerobius*. *Med Microbiol* 1993;16: 61-67.
 23. Macfarlane GT, Gibson GR, Beaty E, Cummings JH. Estimation of short chain fatty acid production from protein by human intestinal bacteria based on branched-chain fatty acid measurements. *FEMS Microbiol Ecol* 1992;101: 81-88.
 24. Furrie E. A molecular revolution in the study of intestinal microflora. *Gut* 2006;55:141-143.
 25. Guimonde M, Salminen S. New methods for selecting and evaluating probiotics. *Dig Liver Dis* 2006; 38: 242 S-247 S.
 26. Vaughan EE, Heilig GHJ, Zoetendal EG, Satokari R, Collins JK, Akkermans ADL, Vos WM. Molecular approaches to study probiotic bacteria. *Trends Food Sci Technol* 1999;10:400-404.
 27. Boyer SL, Flechtner VR, Johansen JR. Is the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria. *Mol Biol Evol* 2001;18:1057-1069.
 28. Sanz JL, Kochling T. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: an overview. *Process Biochem* 2007;42:119-133.
 29. Malik S, Beer M, Megharaj M, Naidu R. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environ Int* 2008; 34: 265-276.
 30. Ziemer CJ, Gibson GR. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *Int Dairy J* 1998; 8:473-479.
 31. Cummings JH, Macfarlane GT. Colonic microflora: nutrition and health. *Nutrition* 1997;13:476-478.
 32. Pryde SE, Duncan SH, Hold G.L, Stewart CS, Flint HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett* 2002;17:133-139.
 33. Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 1987;28:1221-1227.
 34. Csordas A. Butyrate, aspirin and colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev* 1996;5:221-231.
 35. Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel B. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr* 2001; 73:451S-455S.
 36. Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 2000;47:397-403.
 37. FAO/WHO. Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, april 30 and may 1, 2002.

38. Saavedra JM. Clinical application of probiotic agents. *Am J Clin Nutr* 2001;73:1147S-1151S.
39. Mercenier A, Pavan S, Pot B. Probiotic as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. *Curr Pharm Design* 2002;8:99-110.
40. Berg RD. Probiotic, probiotics or conbiotics? *Trends Microbiol* 1998;6:89-92.
41. Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR et al. Functional food science of gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 1998;80:147S-171S.
42. Rafter J. Probiotics and colon cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:849-859.
43. Goldin BR, Gorbach SL. Alterations of the intestinal microflora by diet, oral antibiotics and *Lactobacillus*: decreased production of free amines from aromatic nitro compounds, azo dyes and glucuronides. *J Natl Cancer Inst* 1984;73:689-695.
44. Spanhaak S, Havenaar R, Schaafsma G. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur J Clin Nutr* 1998;52:899-907.
45. Goldin BR. Intestinal microflora: metabolism of drugs and carcinogens. *Ann Med* 1990;22:43-48.
46. Lidbeck A, Nord CE, Gustafsson JA, Rafter J. *Lactobacilli*, anticarcinogenic activities and human intestinal microflora. *Eur J Cancer Prev* 1992;1:341-353.
47. Ling WH, Hänninen O, Mykkänen H, Heikure M, Salminen S, Vonwright A. Colonization and fecal enzyme activities after oral *Lactobacillus GG* administration in elderly nursing home residents. *Ann Nutr Metab* 1992;36:162-166.
48. Marteau P, Pochart P, Flourie B, Pellier P, Santos L, Desjeux JF, Rambaud JC. Effect of chronic ingestion of a fermented dairy product containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities of the colonic flora in humans. *Am J Clin Nutr* 1990;52:685-688.
49. Mital BK, Garg SK. Anticarcinogenic, hypocholesterolemic, and antagonistic activities of *Lactobacillus acidophilus*. *Crit Rev Microbiol* 1995;21:175-214.
50. Cole CB, Fuller R, Mallet AK, Rowland IR. The influence of the host on expression of intestinal microbial enzyme activities involved in metabolism of foreign compounds. *J Appl Bacteriol* 1985;69:549-553.
51. Ling WH, Korpela R, Mykkänen H, Salminen S, Hänninen O. *Lactobacillus* strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive enzyme activities in healthy female adults. *J Nutr* 1994;124:18-23.
52. Goldin BR, Gorbach S.L. Alterations in fecal microflora enzymes related to diet, age, *Lactobacillus* supplements, and dimethylhydrazine. *Cancer* 1977;40:2421-2426.
53. Haberer P, Toit M, Dicks LMT, Ahrens F, Holzapfel WH. Effect of potentially probiotic *lactobacilli* on faecal enzyme activity in minipigs on high-fat, high-cholesterol diet – a preliminary in vivo trial. *Int J Food Microbiol* 2003;87:287-291.
54. Benno Y, Mitsuoka T. Impact of *Bifidobacterium* on human fecal microflora. *Microbiol Immunol* 1992;36:683-694.
55. Ling W. Diet and colonic microflora interaction in colorectal cancer. *Nutr Res* 1995;15:439-454.
56. Shahani KM, Ayebo AD. Role of dietary *lactobacilli* in gastrointestinal microecology. *Am J Clin Nutr* 1980;33:2448-2457.
57. Bartram HP, Scheppach W, Gerlach S, Ruckdeschel G, Kelber E. E. Does yoghurt enriched with *Bifidobacterium longum* affect colonic microbiology and fecal metabolites. *Am J Clin Nutr* 1994;59:428-432.
58. Kopp-Hoolihan L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J Am Diet Assoc* 2001;101:229-241.
59. Zampa A, Silvi S, Fabiani R, Morozzi G, Orpianese C, Cresci A. Effects of different digestible carbohydrates on bile acid metabolism and SCFA production by human gut micro-flora grown in an in vitro semi-continuous culture. *Anaerobe* 2004;10:19-26.
60. Moore WE, Moore LH. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:3202-3207.
61. Knasmüller S, Steinkellner H, Hirschl AM, Rabot S, Nobis EC, Kassie F. Impact of bacteria in dairy products and of the intestinal microflora on the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines. *Mutat Res* 2001;460:129-138.
62. Tannock GW, Munro K, Harmsen HJM, Welling GW, Smart J, Gopal PK. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:2578-2588.
63. Morotomi M, Mutai M. In vitro binding of potent mutagenic pyrolysates to intestinal bacteria. *J Natl Cancer Inst* 1986;77:195-201.
64. Hayatsu H, Hayatsu T. Suppressing effects of *Lactobacillus casei* administration on the urinary mutagenicity arising from ingestion of fried ground beef in the human. *Cancer Lett* 1993;73:173-179.
65. Rowland I, Rummey C, Counts J, Lievense L. Effects of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis* 1998;19:281-285.
66. Goldin B, Gualtieri L, Moore R. The effect of *Lactobacillus GG* on the initiation and promotion of DMH induced intestinal tumours in the rat. *Nut Cancer* 1996;25:197-204.
67. Sivieri K, Spinardi-Barbisan ALT, Barbisan LF, Bedani R, et al. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL183 inhibit chemically induced colon cancer in male Wistar rats. *Eur Food Res Cancer* 2008 [online version].

68. Saxelin M, Tynkkynen S, Mattila-Sandholm T, Vos WM. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr Opin Biotechnol* 2005;16:204-211.
69. Britti MS, Roselli M, Finamore A, Merendino N, Mengheri E. Regulation of immune response at intestinal and peripheral sites by probiotics. *Biologia* 2006;61:735-740.
70. Neuhaus FC, Baddiley J. A continuum of anionic charge: structures and functions of d-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003;67:686-723.
71. Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like Receptor-4 Mediates Lipopolysaccharide-induced Signal Transduction. *J Biol Chem* 1999;274:10689-10692.
72. Watson JL, McKay DM. The immunophysiological impact of bacterial CpG DNA on the gut *Clin Chim Acta* 2006;364:1-11.
73. Veckman V, Miettinen M, Siren J, Matikainen S, Julkunen I. Streptococcus pyogenes and Lactobacillus rhamnosus differentially induce maturation and production of Th1-type cytokines and chemokines in human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2004;75:764-771.
74. Petroff EO, Kojima K, Ropeleski MJ, Musch MW, Tao Y, De Simone C, Chang EB. Probiotics inhibit nuclear factor- κ B and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition *Gastroenterology* 2004;127:1474-1487.
75. Philip R, Epstein I. Tumour necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, β -interferon and interleukin- γ . *Nature* 1986;323:86-89.
76. Raitano A, Kore M. Growth inhibition of a human colorectal carcinoma cell line by interleukin-1 associated with enhanced expression of γ -interferon receptors. *Cancer Res* 1993;53:636-640.
77. Takeuchi H, Maehara Y, Tokunaga E, Koga T, Kakeji Y, Sugimachi K. Prognostic significance of natural killer cell activity in patients with gastric carcinoma: a multivariate analysis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:574-578.
78. Matzuazaki T, Chin J. Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunol Cell Biol* 2000;78:67-73.
79. Nagao F, Nakayama M, Muto T, Okomura K. Effects of a fermented milk drink containing Lactobacillus casei strain Shirota on the immune system in healthy human subjects. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000;64:2706-2708.
80. Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML, Gopal PK. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic Bifidobacterium lactis HN019. *Am J Clin Nutr* 2001;74:833-839.
81. Takagi A, Matsuzaki T, Sato M, Nomoto K, Morotomi M, Yokokura T. Enhancement of natural killer cell cytotoxicity delayed murine caecinogenesis by a probiotic microorganism. *Carcinogenesis* 2001;22:599-605.
82. Berman SH, Eichelsdoerfer P, Yim D, Elmer GW, Wenner CA. Daily ingestion of a nutritional probiotic supplement enhances innate immune function in healthy adults. *Nutr Res* 2006;26:454-459.
83. Matsuzaki T. Immunomodulation by treatment with Lactobacillus casei strain Shirota. *Int J Food Microbiol* 1998;16:133-140.
84. Sekine K, Kawashima T, Hashimoto Y. Comparison of the TNF- α levels induced by human-derived Bifidobacterium longum and rat-derived Bifidobacterium animalis in mouse peritoneal cells. *Bifidobacteria Microflora* 1994;39:79-89.
85. Munkholm P. Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharm Therap* 2003;18:1-5.
86. Perdigón G, Alvarez S, Rachid M, Agüero G, Gobato N. Symposium: probiotic bacteria for humans; clinical systems for evaluation of effectiveness. Immune system stimulation by probiotics. *J Dairy Sci* 1995;78:1597-1606.