

## **PROBIÓTICO *Bacillus Toyoi* REDUZ GLICEMIA, TRIGLICERÍDEOS E ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOZOTOCINA**

**SAMANTHA PERLEBERG VARGAS<sup>1</sup>; SUELY RIBEIRO BAMPY<sup>2</sup>; LUCIELLI SAVEGNAGO<sup>3</sup>; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO<sup>4</sup>; ÂNGELA NUNES MOREIRA<sup>1,5</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Imunologia Aplicada, Biotecnologia, CDTec, UFPel - samipvargas@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Laboratório de Neurobiotecnologia, Biotecnologia, CDTec, UFPel - suely\_rbampi@hotmail.com

<sup>3</sup>Laboratório de Neurobiotecnologia, Biotecnologia, CDTec, UFPel - lucielisavegnago@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Laboratório de Imunologia Aplicada, Biotecnologia, CDTec, UFPel - fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

<sup>5</sup>Departamento de Nutrição, Faculdade de Nutrição, UFPel - angelanmoreira@yahoo.com.br

### **1. INTRODUÇÃO**

Probióticos são micro-organismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, promovem benefícios a seus hospedeiros (FAO-WHO, 2002), como prevenção e tratamento de doenças, como o Diabetes Mellitus (DM), regulação da microbiota intestinal e imunomodulação. Mais recentemente, as propriedades antioxidantes de probióticos, têm recebido atenção (MIKELSAAR et al., 2009).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a defesa antioxidante endógena. Altos níveis de ROS contribuem para a peroxidação lipídica em membranas celulares, aumentando a sua fluidez e permeabilidade. Nesse sentido, tem sido sugerido que o aumento do estresse oxidativo pode desempenhar um papel na patogênese e progressão do dano tecidual diabético (KAKKAR et al., 1995).

DM é uma desordem metabólica crônica, caracterizada pela diminuição da captação de glicose para o tecido muscular e adiposo, resultando em dano tecidual e complicações fisiopatológicas (VALKO et al., 2007). A diabetes induzida por estreptozotocina (STZ) está associada com a formação de ROS e resulta na destruição irreversível das células beta do pâncreas, causando redução da produção e secreção de insulina (ZHANG; TAN, 2000).

*Bacillus cereus* var. *Toyo* (*B. Toyoi*), um probiótico com ação imunomoduladora, apresenta como principal vantagem sobre as bactérias ácido lácticas, a sua capacidade de produzir esporos, o que proporciona uma maior sobrevivência durante a elaboração, transporte, armazenamento do produto alimentício e transporte no trato gastrointestinal (COPPOLA; TURNES, 2004). Porém a sua função como antioxidante e na prevenção e/ou tratamento da DM ainda não tinham sido avaliadas. Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo estudar o efeito do probiótico *B. Toyoi* sobre a DM induzida por STZ em camundongos Swiss.

### **2. METODOLOGIA**

#### **2.1 Produção de *B. Toyoi* e preparo da ração contendo o probiótico**

*B. Toyoi* liofilizada foi recuperada e cultivada em fermentador New Brunswick 110 (New Brunswick Scientific, NJ, USA), em 7 L de meio NYSM acrescido de 15 g.L<sup>-1</sup> de glicerol, com 10% em volume de inóculo. O cultivo ocorreu a 37°C, 500 rpm e 1 vvm de ar durante 48 horas. Após, as condições de temperatura e

rotação foram desligadas, o suprimento de ar foi mantido por 72 horas e a suspensão foi aquecida em banho-maria a 80°C durante 15 minutos para eliminar formas vegetativas do bacilo. O cultivo foi centrifugado a 4000 g por 15 minutos, sob refrigeração de 4°C, concentrado a um volume de 700 mL e a concentração de *B. Toyoi* foi determinada através da diluição em série decimal do cultivo em solução salina (NaCl 0,9%) estéril e da contagem das UFCs.mL<sup>-1</sup> em placas contendo Agar BHI, após a incubação das mesmas a 37°C por 24 h.

Ração comercial para roedores foi triturada, esporos viáveis de *B. Toyoi* foram incorporados ( $10^8$  UFC.g<sup>-1</sup>) e a formulação foi peletizada e mantida em estufa com circulação de ar forçada (18 h a 40°C). Após, a ração foi armazenada a 4°C até a sua utilização e a cada 15 dias foi confirmada sua viabilidade e estabilidade através de contagens em placa.

## **2.2 Avaliação da atividade antioxidante do probiótico *B. Toyoi* sobre a DM induzida por STZ**

Camundongos Swiss machos adultos foram divididos em quatro grupos compostos de 20 animais cada e alimentados por 28 dias, como segue: o grupo controle recebeu ração sem adição de probiótico e não foi induzida a DM; o grupo Diabético recebeu ração sem adição de probiótico e foi induzida a DM com STZ (100 mg.kg<sup>-1</sup> em solução salina 0,9%, em três dias consecutivos, via intraperitoneal); o grupo *B. Toyoi* recebeu ração contendo o probiótico *B. Toyoi* ( $10^8$  UFC.g<sup>-1</sup>) e não foi induzida a DM; e o grupo Diabético + *B. Toyoi* recebeu ração contendo *B. Toyoi* e foi induzida a DM com STZ. Os animais que não receberam STZ foram injetados com solução salina 0,9%. Camundongos tratados com STZ receberam solução de glicose 5% durante 24 horas após a indução de diabetes, a fim de prevenir um choque hipoglicêmico.

Amostras de sangue foram coletadas a partir da veia caudal três dias após a indução da DM para verificar a glicemia de jejum de 6 horas com glicosímetro digital Accu-Check Nano Performa (Roche). Animais com níveis de glicemia maiores ou iguais a 250 mg/dL foram considerados diabéticos. Após, os animais sofreram eutanásia.

Os rins, o fígado e o encéfalo foram rapidamente removidos, colocados em gelo, e homogeneizados em 50 mM de Tris-HCl a pH 7,4. Os homogenatos foram centrifugados durante 10 min a 4000 g, e os sobrenadantes foram utilizados para os testes de peroxidação lipídica (TBARS), de acordo com o método descrito por OHKAWA et al. (1979), ensaios de atividade antioxidante e testes bioquímicos. A atividade da enzima Catalase (CAT) foi determinada por espectrofotômetro, através do método de AEBI (1984), a da superóxido dismutase (SOD) como descrito por MISRA e FRIDOVICH (1972) e a da Glutationa Peroxidase (GPx), utilizando-se kit comercial. Os homogenatos do fígado e rins foram usados para o teste de Thiol não protéico (NSPH) e o plasma obtido por punção cardíaca foi empregado na realização das dosagens bioquímicas de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), triglicerídeos, colesterol total, HDL, creatinina, uréia e glicose, utilizando-se kits comerciais. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (9031-2013).

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os níveis de glicose e triglicerídeos no grupo com DM induzida por STZ, como esperado, foram significativamente ( $p < 0,001$ ) superiores aos do grupo controle. Entretanto, o tratamento prévio com *B. Toyoi* no grupo com DM induzida

diminuiu os níveis de glicose e de triglicerídeos de forma significativa ( $p < 0,01$ ), quando comparados aos níveis do grupo diabético não tratado (Tabela 1).

**Tabela 1.** Efeito do probiótico *B. Toyoi* sobre os níveis de glicose (mg/dL) e triglicerídeos (mg/dL) em camundongos com DM induzida por STZ.

Grupo	Glicose (mg/dl)	Triglicerídeos (mg/dL)
Controle	178,30 ± 40,39	149,17 ± 11,17
Diabético	466,30 ± 36,41 <sup>c</sup>	329,40 ± 220,30 <sup>a</sup>
<i>B. Toyoi</i>	196,60 ± 35,42 <sup>d,e</sup>	94,70 ± 25,48 <sup>b</sup>
Diabético + <i>B. Toyoi</i>	372,60 ± 90,48 <sup>b,c</sup>	65,78 ± 32,29 <sup>b</sup>

Dados apresentados como Média ± S.E.M. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. controle; <sup>b</sup>  $p < 0,01$  vs. diabético; <sup>c</sup>  $p < 0,001$  vs. controle; <sup>d</sup>  $p < 0,001$  vs. diabético; <sup>e</sup>  $p < 0,001$  vs. Diabético + *B. Toyoi*.

GHOUL et al. (2012) também observaram um decréscimo significativo ( $p < 0,05$ ) nos níveis de triglicerídeos em camundongos diabéticos Swiss induzidos por STZ (dose única de 45 mg.kg<sup>-1</sup>) e tratados com extrato aquoso de *Zygophyllum album*, folhas amplamente utilizadas para tratar a hiperglicemia na medicina popular na Tunísia.

A diabetes induzida por STZ resultou em um aumento significativo das atividades de AST e ALT, quando comparadas a do grupo controle. Porém a administração do probiótico *B. Toyoi* não foi capaz de reverter os danos causados pela STZ, de acordo com a Tabela 2.

**Tabela 2.** Efeito do probiótico *B. Toyoi* sobre os parâmetros bioquímicos ALT (U/L) e AST (U/L) em camundongos com DM induzida por STZ.

Grupo	ALT (U/L)	AST (U/L)
Controle	36,56 ± 10,77	67,86 ± 18,06
Diabético	70,50 ± 17,68 <sup>c</sup>	100,20 ± 43,94 <sup>a</sup>
<i>B. Toyoi</i>	42,78 ± 10,22 <sup>d</sup>	60,38 ± 28,44 <sup>b</sup>
Diabético + <i>B. Toyoi</i>	56,11 ± 26,52	80,40 ± 21,57

Dados apresentados como Média ± S.E.M. <sup>a</sup>  $p < 0,005$  vs. controle; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs. diabético; <sup>c</sup>  $p < 0,01$  vs. controle; <sup>d</sup>  $p < 0,01$  vs. Diabético

Como AST e ALT são considerados marcadores de toxicidade do fígado e esse é considerado o órgão metabólico central do organismo, com um importante papel na homeostase da glicose e dos lipídeos, o aumento da atividade das enzimas indica que a DM pode induzir disfunção hepática (RAMESH et al., 2012).

**Tabela 3.** Efeito do probiótico *B. Toyoi* sobre a atividade da glutationa peroxidase (GPx, U/L) e da superóxido dismutase (SOD, U/mg de proteína) nos rins de camundongos com DM induzida por STZ.

Grupo	GPx (U/L)	SOD (U/g proteína)
Controle	12,15 ± 5,773	14,70 ± 1,988
Diabético	104,0 ± 85,2 <sup>a</sup>	17,62 ± 3,296 <sup>b</sup>
<i>B. T.</i>	277,6 ± 62,41 <sup>d,e</sup>	20,34 ± 3,075 <sup>b</sup>
Diabético + <i>B. T.</i>	67,94 ± 51,51 <sup>e</sup>	20,22 ± 3,550 <sup>b</sup>

Dados apresentados como Média ± S.E.M. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. controle; <sup>b</sup>  $p < 0,01$  vs. controle; <sup>c</sup>  $p < 0,01$  vs. diabético; <sup>d</sup>  $p < 0,001$  vs. controle; <sup>e</sup>  $p < 0,001$  vs. diabético; <sup>f</sup>  $p < 0,001$  vs. diabético + *B. T.*

GHOUL et al. (2012) e KAKKAR et al. (1999) descreveram que o aumento da atividade de enzimas antioxidantes poderia ser principalmente uma resposta para o estado diabético, pois a STZ aumentou a atividade das enzimas antioxidantes SOD, GPx e CAT em camundongos diabéticos em relação ao grupo

controle. Contudo, o tratamento com o extrato aquoso de *Zygophyllum album* (*Zygophyllaceae*), bem como o tratamento de animais diabéticos com *B. Toyoi* no presente estudo foram capazes de reduzir tais atividades enzimáticas. Dessa forma, o resultado da GPx nos rins sugere que *B. Toyoi* foi capaz de proteger este tecido contra o dano oxidativo, uma vez que os animais diabéticos alimentados com *B. Toyoi* mostraram atividade enzimática diminuída em relação ao grupo diabético.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que o probiótico *B. Toyoi* é capaz de proteger os rins contra situações de estresse oxidativo e que pode ser utilizado para a prevenção e tratamento adjuvante da DM, visto que em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina foi capaz de reduzir os níveis de glicose e triglicerídeos no sangue e foi capaz de reduzir a necessidade do recrutamento das enzimas antioxidantes GPx e SOD nos rins.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COPPOLA, M. M.; TURNES, C.G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1297-1303, 2004.
- FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.
- GHOUL, J.E.; SMIRI, M.; GHRAB, S.; BOUGHATTAS, N.A.; BEN-ATTIA, M. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant activities of traditional aqueous extract of *Zygophyllum album* in streptozotocin diabetic mice. **Pathophysiology**, v.19, n.1, p.35–42, 2012.
- KAKKAR, A.K.; CHINSWANGWATANAKUL, V.; LEMOINE, N.R.; TEBBUTT, S.; WILLIAMSON, R.C. Role of tissue factor expression on tumour cell invasion and growth of experimental pancreatic adenocarcinoma. **British Journal of Surgery**, v.86, n.7, p.890–894, 1999.
- KAKKAR, R.; KALRA, J.; MANTHA, S.V.; PRASAD, K. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.151, n.2, p.113–119, 1995.
- MIKELSAAR, M.; ZILMER, M. *Lactobacillus fermentum* ME-3—an antimicrobial and antioxidative probiotic. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.21, n.1, p.1–27, 2009.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v.95, n.2, p.351-358, 1979.
- RAMESH, B.; KARUNA, R.; SREENIVASA, R.S.; HARITHA, K.; SAI, M.D.; SASI, B.R.B.; SARALAKUMARI, D. Effect of *Commiphora mukul* gum resin on hepatic marker enzymes, lipid peroxidation and antioxidants status in pancreas and heart of streptozotocin induced diabetic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.2, n.11, p.895-900, 2012.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, n.1, p.44–84, 2007.
- ZHANG, X.F.; TAN, B.K. Antihyperglycaemic and anti-oxidant properties of *Andrographis paniculata* in normal and diabetic rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.27, n.5–6, p.358–363, 2000.