

## AÇÃO DE BACTÉRIA COM POTENCIAL PROBIÓTICO NA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA HEPÁTICA DE RATOS INDUZIDOS AO CÂNCER DE CÓLON, SUBMETIDOS À DIETA PADRÃO E HIPERPALATÁVEL

NATALIE GARCIA CHAVES<sup>1</sup>; ITIANE BARCELLOS JASKULSKI<sup>2</sup>; JULIA UECKER<sup>2</sup>; FERNANDA MOURA<sup>2</sup>; TAICIANE GONÇALVES<sup>2</sup>; SIMONE PIENIZ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – nataliechaves@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – itianebarcellosj@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – julia\_uecker@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – fezinhamrt@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – ta.ici@hotmail.com

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas – nutrisimone@yahoo.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo está associado a processos fisiológicos como o envelhecimento e doenças crônicas, tais como aterosclerose, diabetes e câncer. Pode ser definido como resultado do desequilíbrio entre a produção de espécies oxidantes e a defesa do sistema antioxidante do organismo (GOETZ & LUCH 2008; STEPHENS et al. 2009), este desequilíbrio pode resultar na morte celular, após oxidação generalizada de lipídios (STEPHENS et al. 2009).

É evidente que o consumo de gordura tem aumentado gradativamente de forma mundial e, este fato, aliado a alta quantidade energética contida nos alimentos consumidos, certas composições dietéticas que associam o consumo excessivo de gorduras saturadas e sal, e o consumo insuficiente de frutas e hortaliças, aumentam a adiposidade corporal e apresentam forte associação com doenças (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Relatos na literatura sugerem uma associação entre fatores dietéticos, principalmente entre a ingestão de alimentos hiperlipídicos com o risco aumentado de câncer de cólon (MCINTOSH et al. 1999). O câncer de cólon em termos de incidência, é a terceira causa mais comum de câncer no mundo em ambos os sexos e a segunda causa em países desenvolvidos (INCA 2016). Alimentos deficientes em fibras, associado a uma dieta com elevada concentração de gorduras e proteínas de origem animal, pode favorecer o aumento da produção de ácidos biliares hepáticos, que funcionam como substratos para a geração de carcinógenos e promotores de câncer de cólon (ROBERFROID et al. 2010), além de produzir metabólitos tóxicos e reduzir a hidrólise de fármacos (NALINI et al. 2006).

Os probióticos são micro-organismos vivos encontrados na microbiota intestinal, com baixa ou nenhuma patogenicidade, os quais apresentam efeitos positivos sobre a saúde do hospedeiro. A literatura relata o envolvimento da microbiota exógena ao desenvolvimento do câncer, sendo que estudos realizados por Goldin & Gorbach em 1980 e por McIntosh et al. em 2009 sugerem o efeito de duas cepas probióticas específicas na redução de tumores no cólon de roedores induzidos por 1-2, dimethylhidrazina (DMH).

O DMH é um agente cancerígeno utilizado na indução de câncer de cólon (HOFFMAN-GOETZ 2003). A exposição ao DMH provoca hipermetilação do DNA das células do cólon, sendo que, este composto, é metabolizado no fígado, resultando da produção de íons eletrofílico de diazônio causando o estresse oxidativo (HOFFMAN-GOETZ 2003). A indução também pode ocorrer por meio de

um possível mecanismo o qual a microbiota intestinal venha a expressar agentes mutagênicos pela produção de ácidos biliares ou ativação de enzimas com efeitos mutagênicos presentes no intestino grosso (MANJU & NALINI 2007), que são semelhantes ao que ocorre com a alimentação em alta concentração de gorduras e pobre em fibras.

Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como indicador de peroxidação lipídica, em tecido hepático de ratos *Wistar* induzidos ao câncer de colônus, suplementados com bactéria probiótica (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) e submetidos à dieta padrão e dieta hiperpalatável.

## 2. METODOLOGIA

O experimento *in vivo* foi realizado no Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição, da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), sendo o projeto de pesquisa previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPEL sob o número 7477. Para o desenvolvimento deste experimento, foram utilizados 55 ratos machos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*) com 90 dias, pesando entre 420 e 435 g, provenientes do Biotério Central da Universidade de Federal de Pelotas – UFPEL, os quais foram alocados em caixas de polipropileno com base em arame/aço, e mantidos a temperatura e umidade relativa de 22-24°C e 65-75%, respectivamente, com ciclo claro/escuro de 12 horas.

O ensaio biológico teve duração de 90 dias com sete dias de adaptação e 83 dias de experimento. Os modelos biológicos (n=55) foram divididos em oito grupos de quatro animais que receberam as seguintes dietas: Dieta padrão (ração Nuvilab®); Dieta padrão + probiótico ( $10^8$  UFC mL $^{-1}$ ); Dieta hiperpalatável; Dieta hiperpalatável + probiótico; Dieta padrão + DMH (20 mg/ Kg de peso corporal); Dieta padrão + probiótico + DMH ; Dieta hiperpalatável + DMH; Dieta hiperpalatável+ probiótico + DMH. Todos os grupos receberam água *ad libitum*.

Ao final do experimento os ratos foram deixados em jejum de três horas e, posteriormente, sedados e eutanasiados por punção cardíaca (COBEA 1991).

Após, foi realizada a incisão dos órgãos, sendo estes armazenados e congelados a -80°C até o momento da análise de peroxidação lipídica, por meio da metodologia de OHKAWA, OHISHI, YAGI (1979). A concentração de TBARS foi quantificada por leitura em espectrofotômetro (532 nm), e os resultados expressos em nmol de MDA g $^{-1}$ . As análises foram realizadas em triplicatas.

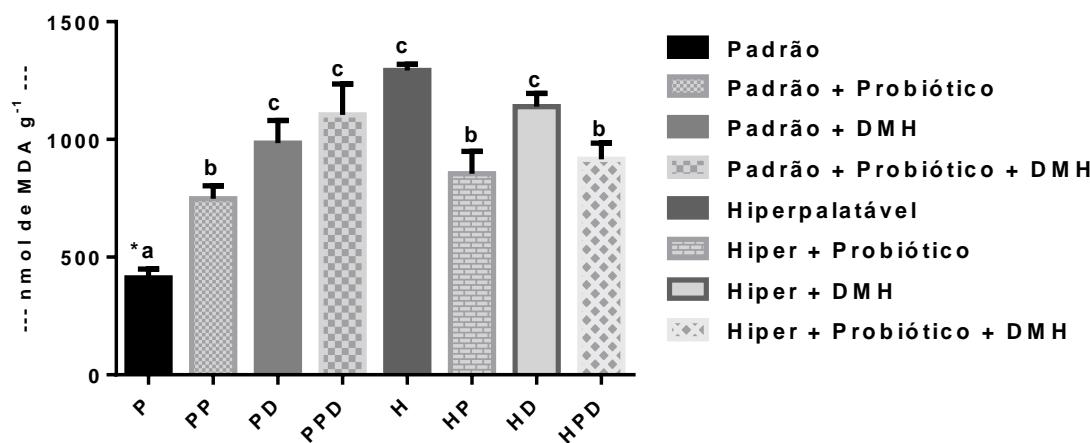
Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Os valores foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, para verificação da existência de diferenças estatísticas entre as médias, com nível de significância de 5% para as variáveis analisadas.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados no presente estudo demonstraram que a suplementação com o probiótico (*L. lactis* subsp. *lactis*) quando submetido a dieta padrão não teve efeito significativo sobre a inibição da peroxidação lipídica hepática ( $p>0,05$ ) (Figura 1).

Inversamente, quando administrada dieta hiperpalatável e suplementados com probiótico observou-se efeito protetor na peroxidação lipídica. Foi observado um maior efeito inibitório no grupo HP ( $p<0,05$ ) e, de acordo com a literatura, a suplementação com probióticos vêm sendo amplamente investigada, uma vez

que eles podem apresentar funções importantes em condições de estresse oxidativo e inflamatório causados pelo alto consumo de gordura, a partir da redução da produção de mediadores inflamatórios por atuarem em vias de sinalização celular e serem capazes de alterar o padrão de expressão de determinados genes (LATVALA et al. 2011). Em *Lactococcus lactis*, a hipótese é de que produtos do gene *recA*, minimizem o estresse oxidativo como forma de reparação do DNA (RALLU et al. 2000).



**Figura 1.** Inibição da peroxidação lipídica hepática em ratos da linhagem *Wistar* induzidos ao câncer de cólon com DMH, submetidos a dieta padrão e hiperpalatável. \*Valores com letras iguais não apresentam diferença estatística significativa entre os grupos.

Quando os animais foram induzido ao câncer com o DMH (HPD), observou-se que o probiótico apresentou efeito protetor contra a oxidação causada pelo DMH concomitante a dieta hiperpalatável ( $p<0,05$ ). O DMH é metabolizado principalmente no fígado, e em alguma extensão do cólon, sendo que o metabólito final leva à formação de radicais livres e peróxido de hidrogênio provocando estresse oxidativo devido ao desequilíbrio de espécies reativas ao oxigênio e antioxidantes endógenos (KHAN & SULTANA 2011).

#### 4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos conclui-se que, a bactéria probiótica *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* possui potencial proteção da oxidação em tecido hepático de ratos, com menor produção de espécies reativas em grupos submetidos à dieta hiperpalatável e expostos ao DMH. Entretanto, há necessidade de mais estudos que avaliem e elucidem as características antioxidantes e metabólicas da bactéria probiótica em relação ao consumo de dieta padrão.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COBEA. Princípios éticos na experimentação animal. 1991. [Acesso 08/06/2016]. Disponível em: <http://www.cobea.org.br>.
- GOETZ, E., LUCH, A. Reactive species: A cell damaging rout assisting to chemicalcarcinogens. *Cancer letters*, v.266, n.1, p.73–83, 2008.

HOFFMAN-GOETZ L. Physical activity and cancer prevention: animal-tumor models. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 35, n.11, p. 1828-1833, 2003.

Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>

KHAN, R., SULTANA, S. Farnesol attenuates 1,2-dimethylhydrazine induced oxidative stress, inflammation and apoptotic responses in the colon of Wistar rats. **Chemico-Biological Interactions**, v.192, n.3, p.193–200, 2011.

LATVALA, S., MIETTINEN, M., KEKKONEN, A., KORPELA, R., JULKUNEN, I. *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Streptococcus thermophilus* induce suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) gene expression directly and indirectly via interleukin-10 in human primary macrophages. **Clinical & Experimental Immunology**, UK, v.165, n.1, p.94–103, 2011.

MANJU, V., NALINI, N. Protective role of luteolin in 1, 2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. **Cell biochemistry and function**, v.25, n.2, p.189-194, 2007.

MCINTOSH, H., ROYLE, J., PLAYNE, J. A probiotic strain of *L. acidophilus* reduces DMH-induced large intestinal tumors in male Sprague-Dawley rats. **Nutrition and cancer**, v.35, n.2, p.153-159, 1999.

NALINI, N., MANJU, V., MENON, V. P. Effect of spices on lipid metabolism in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Journal of medicinal food**, v.9, n.2, p.237-245, 2006.

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.

RALLU, R., GRUSS, A., EHRLICH, S.D., MAGUIN, E. Acid-and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis*: identification of intracellular signals. **Molecular Microbiology**, v.35, n.3, p.517-528, 2000.

ROBERFROID, M., GIBSON, G. R., HOYLES, L., Mccartney, A. L., RASTALL, R., ROWLAND, I., GUARNER, F. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v.104, n.2, p.1-63, 2010.

STEPHENS, W., KHANOLKAR, P., BAIN, C. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. **Atherosclerosis**, v.202, n.2, p.321–329, 2009.