

PROBIÓTICO *B. TOYONENSIS* REDUZ PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NOS RINS DE CAMUNDONGOS SWISS

GIULI ARGOU MARQUES¹; SUELY RIBEIRO BAMPY², KHADIJA BEZERRA MASSAUT², FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO², LUCIELLI SAVEGNAGO²; ÂNGELA NUNES MOREIRA³

¹Universidade Federal de Pelotas – giulizynhah@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – suely_rbampi@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – khadijamassaut@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – lucielisavegnago@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

³Universidade Federal de Pelotas – angelanmoreira@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O papel de uma alimentação saudável na manutenção da saúde tem despertado interesse dos consumidores e da comunidade científica, o que vem estimulando inúmeros estudos com o intuito de comprovar a atuação de componentes bioativos na redução e prevenção de riscos de certas doenças (BADARÓ, et al., 2008), como os probióticos. Probióticos podem ser definidos como micro-organismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO-WHO, 2002), dentre eles: controle da microbiota intestinal; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes a lactose; estimulação do sistema imune, entre outros (SAAD, 2006).

Outro benefício importante associado aos probióticos refere-se à atividade antioxidante. Essa atividade vem sendo investigada pela contribuição que pode proporcionar na inibição da oxidação dos alimentos, bem como pela prevenção ou inibição dos danos oxidativos provocados aos organismos vivos pela produção de radicais livres como reportados por SHOKRYAZDAN; TZANG e FARDET (2017).

A geração de radicais livres constitui, por excelência, um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de ATP (energia), por meio da cadeia transportadora de elétrons; fertilização do óvulo; ativação de genes; e participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção. Porém, a produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos (BARBOSA, 2010). O estresse oxidativo tem sido definido como um distúrbio no estado de equilíbrio, no sistema de pró-oxidantes e antioxidantes, nas células intactas (JORDÃO, 1998).

Tendo isto em vista, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se os probióticos *Bacillus Toyonensis* e *Saccharomyces boulardii*, além de apresentarem os efeitos benéficos já comprovados como probióticos, apresentam efeitos de defesa aos radicais livres, exercendo o mecanismo antioxidante nos órgãos: cérebro, rins e fígado, em testes utilizando o modelo animal camundongo Swiss.

2. METODOLOGIA

ANIMAIS

Camundongos Swiss machos, com 60 a 75 dias, pesando entre 25 e 30 g foram mantidos no Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), à temperatura de 22 a 25°C, em ciclos de 12 h de claro/escuro. Os animais tinham acesso livre a água e comida e eram mantidos em gaiolas separadas com 3 a 5 animais/gaiola, totalizando 28 animais. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPel (processo 9031-2013).

PRODUÇÃO DOS PROBIÓTICOS

As cepas de *B. toyonensis* e *S. boulardii* utilizadas durante o experimento foram cedidas pelo Laboratório de Imunologia Aplicada, do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da UFPel.

As bactérias liofilizadas de *B. toyonensis* foram cultivadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) por 16 a 18 h a 37°C, sobre agitação de 200 rpm em agitador orbital. Inóculo de 700mL foi adicionado a 7L de caldo NYSM e o cultivo foi incubado em biorreator (Bioflo 110 New Brunswick Scientific, NJ, USA) a 37°C, 500 rpm e 1 vvm de ar por 48 h. Ao final deste periodo, a temperatura e agitação foram desligados. O suprimento de ar foi mantido para fermentação por 72 h. Após o periodo de fermentação, as células foram centrifugadas a 4000 g por 15 min, sob refrigeração de 4°C, lavadas com solução salina 0,9% (NaCl 0,9%) e concentradas 10x. As celulas foram aquecidas a 80°C por 15 min para eliminar as formas vegetativas do *Bacillus*. A contagem de células viáveis foi realizada por meio de plaqueamento de diluições seriadas decimais em ágar BHI, após incubação a 37°C por 24 h.

As leveduras liofilizadas de *S. boulardii* foram suspensas em salina e plaqueadas em ágar contendo extrato de levedura, peptona e dextrose YPD e as placas foram incubadas por 42 h à 28°C. Após incubação, 50 µL de suspensão contendo de 3 a 5 colônias foram adicionados a 70 mL de caldo YPD e incubados a 28°C, por 24 h, sob agitação de 200 rpm em agitador orbital. Então, 70 mL do inóculo foi adicionado a 700 mL de caldo YPD e o cultivo novamente incubado sob os mesmos parâmetros por mais 24 h. A fermentação ocorreu em New Brunswick (New Brunswick Scientific, NJ, USA). Foram utilizados 7 L de meio YPD suplementado com glicerol 15 g.L⁻¹, previamente autoclavados a 121°C por 45 min, sendo que 10% do volume foi de inóculo. A fermentação ocorreu a 28°C por 24 h sob condições controladas. Após a fermentação, as células foram recuperadas por centrifugação a 4000 g por 15 min e concentradas a um volume de 700 mL em solução salina 0,9% estéril sob refrigeração. A concentração foi determinada por diluição seriada decimal em solução salina 0,9% e contagem em placas contendo ágar YPD (UFC.mL⁻¹).

PREPARAÇÃO DA RAÇÃO CONTENDO PROBIÓTICO

Foi utilizada ração comercial Nuvilab (Sogorb Indústria e Comércio Ltda) do Biotério Central da UFPel como base e os probióticos *S. boulardii* (10^9 UFC.g⁻¹) e/ou os esporos viáveis de *B. toyonensis* (10^8 UFC.g⁻¹) foram adicionados. A preparação foi peletizada e mantida em forno com circulação forçada de ar por aproximadamente 24 h a 40°C. Após, a dieta foi mantida em temperatura ambiente até o uso e a cada 15 dias foi realizada quantificação de micro-organismos (UFC.g⁻¹) para verificar a viabilidade e estabilidade.

EFEITO DOS PROBIÓTICOS, INDIVIDUALMENTE E EM CONJUNTO, EM BIOMARCADOR DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS SWISS POR 60 DIAS

Os camundongos foram separados em quatro grupos: controle (n=7, grupo controle recebendo dieta sem adição de probióticos), S.b. (n=7, grupo recebendo

dieta contendo 10^9 UFC por g de *S. boulardii*), B.T. (n=7, grupo recebendo dieta contendo 10^8 UFC por g de *B. toyonensis*) e S.b. + B.T. (n=7, grupo recebendo dieta contendo os dois probióticos). O experimento durou 60 dias.

PREPARAÇÃO DOS TECIDOS

Os animais foram anestesiados e eutanasiados e o fígado, os rins e o cérebro foram rapidamente removidos, pesados e homogeneizados em 50 mM de Tris/HCl, pH 7,4 (1/10, w/v). Os tecidos homogeneizados foram centrifugados a 4000 g, por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para o teste de espécies reativas ao ácido barbitúrico (TBARS).

ATIVIDADE ANTIOXIDATIVA

Os níveis de TBARS foram determinados como descrito por OHKAWA (1979) nos tecidos do fígado, dos rins e do cérebro.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta os resultados do efeito de *S. boulardii* e *B. toyonensis*, individualmente e em associação, nos níveis de TBARS nos rins de camundongos Swiss. O grupo que recebeu a dieta contendo B.T., administrado individualmente, apresentou níveis menores de peroxidação lipídica quando comparado ao grupo controle ($p<0,0001$) e ao grupo S.b. ($p<0,005$). A associação dos probióticos diminuiu a peroxidação lipídica comparado ao grupo controle ($p<0,05$). No fígado e no cérebro dos camundongos, não houve diferença estatística nos níveis de TBARS.

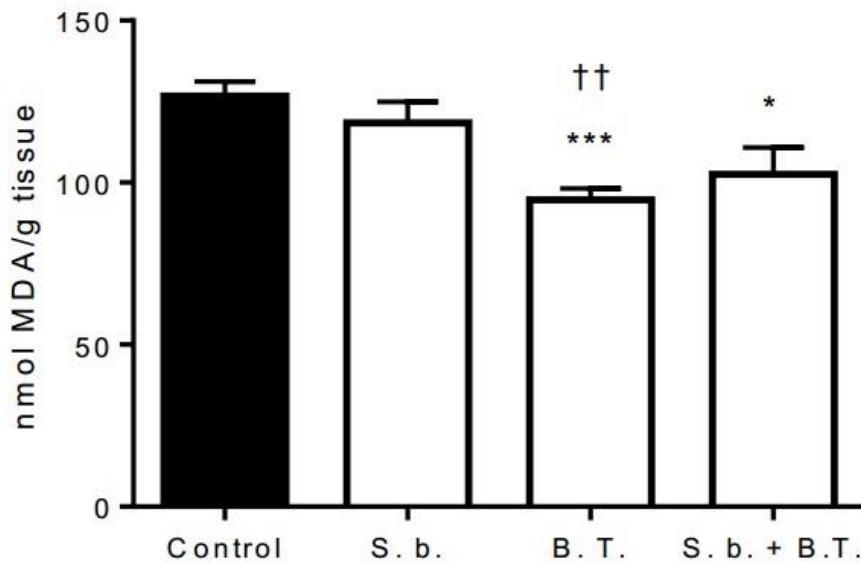


Figura 1: Efeito de *S. boulardii* e *B. toyonensis*, individualmente e em conjunto, na avaliação dos níveis de espécies reativas ao ácido barbitúrico (TBARS) nos rins de camundongos swiss.

Os mecanismos pelos quais o *B. toyonensis* é capaz de reduzir a peroxidação lipídica ainda não foi elucidado, mas é possível visualizar, de acordo com esse estudo, que mesmo em uma baixa concentração de células esporuladas (10^8 UFC.g⁻¹) foi capaz de demonstrar benefícios em comparação com outros estudos, como os demonstrados por CALCINARO (2005); PARK (2013) e CHEN (2014).

Mesmo que o mecanismo ainda não seja explicado, probióticos tem sido reportados por melhorar a absorção de antioxidantes e reduzir as concentrações lipídicas no período pós-prandial, ações diretamente relacionadas com o estresse oxidativo (MIKELSAAR, 2009).

4. CONCLUSÕES

B. toyonensis é capaz de proteger o rim contra situações de estresse oxidativo, visto que reduziu a peroxidação lipídica neste órgão, fato observado através da redução dos níveis de TBARS.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BADARÓ, A. C. L.; GUTTIERRES, A. P. M.; REZENDE, A. C. V.; STRINGHETA, P. C. Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana – parte 1. **Nutrir Gerais – Revista Digital de Nutrição**, Ipatinga-MG, v. 2, n. 3, p. 1-20, 2008.

FAO/WHO. 2002. **Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization**. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Working Group Report, London, p. 1-11.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 01-16, 2006.

SHOKRYAZDAN, P.; JAHROMI, M.F.; LIANG, J. B.; HO, Y. W. Probiotics: From Isolation to Application, **Journal of the American College of Nutrition**, 1-11, sep. 2017.

TZANG, B.; LIU, C.; HSU, K.; CHEN, Y.; HUANG, C.; HSU, T. Effects of oral *Lactobacillus* administration on antioxidant activities and CD4 CD25 forkhead box P3 (FoxP3) T cells in NZB/W F1 mice. **British Journal of Nutrition**, 118(5), 333-342, sep. 2017.

FARDET, A.; ROCK, E. In vitro and in vivo antioxidant potential of milks, yogurts, fermented milks and cheeses: A narrative review of evidence. **Nutrition Research Reviews**, 1-19, oct. 2017.

BARBOSA, K. B. F.; et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 23, n. 4, Jul/Ago. 2010.

JORDÃO, Jr. A. A.; et al. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina, Ribeirão Preto**, 31: 434-449, jul./set. 1998.

OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K. Assay for lipid peroxidation in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.** 95, 351– 358, 1979.

PARK, Do-Y.; AHN, Y. T.; HUH, C. S.; MCGREGOR, R. A.; CHOI, M.S. Dual probiotic strains suppress high fructose-induced metabolic syndrome World. **J. Gastroenterol.** 14; 19(2): 274-283, 2013.

CHEN, P., et al. Antidiabetic effect of *Lactobacillus casei* CCFM0412 on mice with type 2 diabetes induced by a high-fat diet and streptozotocin. **Nutrition** 30 1061–1068, 2014.

CALCINARO, F.; et al. Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. **Diabetologia**, 48:1565–1575, 2005.

MIKELSAAR, M.; ZILMER, M. *Lactobacillus fermentum* ME-3—an antimicrobial and antioxidative probiotic. **Microb Ecol Health Dis**, 21:1-27, 2009.