

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO DE CAMUNDONGOS SWISS SAUDÁVEIS SUPLEMENTADOS COM LEVEDURA PROBIÓTICA

GIULI ARGOU MARQUES¹; KHADIJA BEZERRA MASSAUT²; RAFAEL RODRIGUES RODRIGUES²; LISLEI SCHERWINSKE GRÜTMANN²; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO²; ÂNGELA NUNES MOREIRA³

¹Universidade Federal de Pelotas – giulizynhah@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – khadijamassaut@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – rafaelr458@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – lyz_sls@hotmail.com

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

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

1. INTRODUÇÃO

Probióticos podem ser definidos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, proporcionam benefícios à saúde do hospedeiro (FAO, 2006), como: estimulação do sistema imune, controle da microbiota intestinal; estabilização e reversão da disbiose após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes a lactose, entre outros (SAAD, 2006). E, no intuito de promover uma melhora na qualidade de vida da população em geral, os efeitos benéficos proporcionados pelos alimentos ditos funcionais, principalmente os probióticos, têm sido estudos pelos profissionais da área da saúde (FAO, 2006).

As leveduras *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* mostram-se particularmente promissoras, pois demonstram vantagem em relação às bactérias, uma vez que não são inibidas por fatores antibacterianos (MARTINS et al., 2005).

Pichia pastoris é uma levedura da família Saccharomycetaceae, gênero *Pichia*, que pode ser utilizada na produção de proteínas recombinantes em larga escala (SIEDLER et al., 2017). Estudos com a levedura demonstraram melhora na conversão alimentar de aves saudáveis (GIL DE LOS SANTOS et al., 2012; GABOARDI et al., 2016), redução da mortalidade de camundongos desafiados com *Salmonella Typhimurium* (FRANÇA et al., 2015), efeito protetor à hepatotoxicidade e redução dos níveis de TBARS de animais imunossuprimidos pela aplicação de quimioterápico (CUNHA, 2016).

Sob este contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação com a levedura *P. pastoris* sobre o estresse oxidativo em camundongos Swiss saudáveis.

2. METODOLOGIA

2.1 Cultivo do probiótico

A levedura *P. pastoris* (X-33), suspensa em glicerol a 80% e armazenada a -20º C, proveniente do banco de micro-organismos do Núcleo de Biotecnologia (CDTec-UFPel), foi inoculada, em sua totalidade (2 mL), em 10 mL de caldo Yeast Malt (YM) e incubada por 24 h, a 28ºC em agitador orbital a 200 rpm. Após, os 10 mL do cultivo foram adicionados a 90 mL de caldo YM e o cultivo foi incubado novamente, sob as mesmas condições durante 24 h. Finalizando o processo, os 100 mL desse cultivo foram transferidos para 1,4 L de YM e incubado por mais 24

h a 28°C sob agitação de 200 rpm em agitador orbital. Por fim, as células foram recuperadas por centrifugação a 5000 g por 15 minutos a 4°C e o pellet celular foi lavado duas vezes com 300 mL de solução salina (NaCl 0,9%) através da centrifugação nas mesmas condições. Na etapa final, o cultivo foi concentrado a um volume de 300 mL em solução salina 0,9% estéril e armazenado sob refrigeração durante todo o período do estudo. A concentração de *P. pastoris* (expressa em UFC/mL) foi determinada através de diluição seriada decimal em solução salina 0,9% estéril e contagens em placas contendo Agar YM, após incubação das placas a 37°C por 24 h.

2.2 Manejo de animais e delineamento experimental

A duração do experimento foi de 17 dias e utilizou-se 30 camundongos Swiss machos, com 28 dias de idade. Os camundongos foram divididos em dois grupos: grupo suplementado diariamente com *P. pastoris* (PP) e grupo não suplementado, controle (C).

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) sob o nº 23110.006974/2015-40.

2.3 Suplementação com o probiótico

O grupo PP recebeu suplementação diária de 10⁸ UFC/animal da levedura *P. pastoris* no volume de 200 µl de solução salina por gavagem durante todo o experimento. Já o grupo C recebeu 200 µl de solução salina (NaCl 0,9%) pela mesma via, no intuito de simular o mesmo nível de estresse.

2.4 Estresse oxidativo

Os órgãos fígado, encéfalo e rins foram removidos assepticamente durante a eutanásia, sendo o encéfalo, um dos rins e dois terços do fígado acondicionados em micro tubos e imediatamente congelados em ultra freezer a -70°C, durante o período máximo de 30 dias, para a avaliação do estresse oxidativo. Posteriormente, para preparo da amostra, foi realizada a pesagem do órgão (não ultrapassando 0,5 mg de tecido) e a adição da solução de tampão Tris em volumes adequados (cinco vezes o peso do cérebro e dez vezes o peso dos demais órgãos) para realização da homogeneização manual. O material foi centrifugado em tubos de ensaio a 3,2 g por 10 minutos à temperatura ambiente, para separação do pellet, e os sobrenadantes foram coletados para realização das análises espectrofotométricas da formação de malondealdeído (MDA), através do protocolo descrito por Ohkawa et al. (1979), e da atividade da enzima catalase (CAT), conforme descrito por Aebi (1984).

2.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no programa Graphpad Prism 6.0 através do Teste t considerando-se o nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 podem ser observados valores médios dos níveis de TBARs e de atividade da enzima catalase nos animais suplementados ou não com a levedura *P. pastoris*.

Tabela 1: Médias \pm desvio padrão de concentrações finais (dia 17) dos marcadores de estresse oxidativo TBARs e catalase, por tecido por grupo, de camundongos Swiss machos suplementados diariamente com *P. pastoris* (PP) e não suplementados, controle (C) (n=29).

Marcadores de Estresse oxidativo / tecido	Médias dos valores encontrados nos grupos (\pm desvio padrão)	
	Controle	PP
Rim		
TBARS (nmol de MDA/g)	271,37 \pm 56,98	231,56 \pm 33,91*
Catalase (UCAT/mg)	5,40 \pm 0,61	3,45 \pm 0,79*
Fígado		
TBARS (nmol de MDA/g)	102,86 \pm 24,75	144,26 \pm 44,07**
Catalase (UCAT/mg)	5,78 \pm 1,76	6,34 \pm 1,73**
Encéfalo		
TBARS (nmol de MDA/g)	80,31 \pm 32,88	67,70 \pm 9,20
Catalase (UCAT/mg)	9,66 \pm 3,58****	2,84 \pm 1,28**

* p<0,05 ** p<0,01 (Teste T)

Segundo Chen et al. (2013), distintas causas são capazes de desencadear o estresse oxidativo, sendo o uso da terapia probiótica um fator cada vez mais eficaz no auxílio da redução do mesmo. Esse efeito protetor pode ser atribuído à redução do risco de acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e pela reativação de enzimas antioxidantes (Ou et al. 2012). Conforme demonstrado na Tabela 1, foram observados valores médios de níveis de TBARs significativamente menores nos rins do grupo que recebeu o probiótico.

A observação de níveis elevados de atividade da enzima catalase demonstra uma redução no estresse oxidativo celular, fato este detectado no presente estudo, sendo verificadas diferenças significativas no fígado, cujos valores foram significativamente maiores no grupo PP.

Observa-se ainda que nos rins e encéfalo também foram encontradas diferenças significativas, no entanto, a atividade da enzima foi reduzida com a suplementação, sugerindo que a levedura causou efeito inverso ao desejado nos animais, evento também observado nos níveis de MDA do fígado, onde houve aumento com a administração, quando comparado ao grupo controle.

4. CONCLUSÕES

Foram observadas alterações significativamente positivas em relação à utilização de *P. Pastoris*, sobre a peroxidação lipídica nos rins e a atividade da enzima catalase no fígado. No entanto, estudos adicionais com outros métodos de mensuração de estresse oxidativo fazem-se necessários para uma melhor compreensão da ação da levedura.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

OKAWA, H. NOBUKO, A.; YAGI, K. Assay for lipid peroxidation in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Analalitical Biochemistry*, v. 95, p. 351-358, 1979.

AEBI H. Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, v. 105, p. 121- 126, 1984.

FAO. Probióticos em los alimentos: Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. **Estudio FAO Alimentación y Nutrición**. Roma, p. 52, 2006.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1, p. 01-16, 2006.

SIEDLER, B. S.; et al. Secretory expression of bovine herpesvirus type 1/5 glycoprotein E in *Pichia pastoris* for the differential diagnosis of vaccinated or infected cattle. **Protein Expression and Purification**, v.130, p.21-27, 2017.

CUNHA, L. R. **Efeito da levedura *Pichia pastoris* sobre parâmetros imunológicos e de estresse oxidativo em camundongos Swiss submetidos à quimioterapia com ciclofosfamida**. 2016. 99 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de pós-graduação em Nutrição e Alimentos, UFPel.

CHEN, L.; LIU, W.; LI, Y.; LUO, S.; LIU, Q.; ZHONG, Y.; JIAN, Z.; BAO, M. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 attenuates the atherosclerotic progression through modulation of oxidative stress and inflammatory process. **International Immunopharmacology**, v.17, p. 108-115, 2013.

FRANÇA, R. C.; CONCEIÇÃO, F. C.; MENDONÇA, M.; HAUBERT, L.; SABADIN, G.; OLIVEIRA, P. D.; AMARAL, M. G.; SILVA, W. P; MOREIRA, A. N. *Pichia pastoris* X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against *Salmonella Typhimurium*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99, p. 7953–7961, 2015.

GABOARDI, G. C.; ALVES, D.R.; GRIEP, E.; RODRIGUES, A.; FINGER, P.; CONCEIÇÃO, F. R. Suplementação de ração para codornas com *Pichia Pastoris* X-33 produzida em resíduos industriais e o impacto no desempenho zootécnico. In: **IX Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada ISSN 2237-1672**. Porto Alegre-RS, 2016, **Anais...**

GIL DE LOS SANTOS, J. R.; STORCH, O. B.; FERNANDES, C. G.; GIL-TURNES, C. Evaluation in broilers of the probiotic properties of *Pichia pastoris* and a recombinant *P. pastoris* containing the *Clostridium perfringens* alpha toxin gene. **Veterinary Microbiology**, v. 156, p. 448–451, 2012.

MARTINS, F. S.; BARBOSA, F. H. F.; PENNA, F. J.; ROSA, C. A.; NARDI, R. M. D.; NEVES, M. J.; NICOLI, J. R. Estudo do potencial probiótico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* através de testes in vitro. **Rev BioCie**, v. 5, n. 2, p. 1–13, 2005.

OU, C.C.; CHIU, Y.H.; LIN, S.L.; CHANG, Y.J.; HUANG, H.Y.; LIN, M.Y. Hepatoprotective Effect of Lactic Acid Bacteria in the Attenuation of Oxidative Stress from tert-Butyl Hydroperoxide. **Journal of food and drug analysis**, v. 20, n. 1, p. 101-110, 2012.