

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE CAMUNDONGOS *Swiss* IMUNOSSUPRIMIDOS COM CICLOFOSFAMIDA E SUPLEMENTADOS COM PROBIÓTICO

RAFAEL RODRIGUES RODRIGUES¹; KHADIJA BEZERRA MASSAUT²; GIULI
ARGOU MARQUEME³; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO⁴; ANGELA NUNES
MOREIRA⁵

¹Universidade Federal de Pelotas- rafelr458@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas- khadijamassaut@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas- giulizynhah@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas- fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

⁵Universidade Federal de Pelotas- angelanmoreira@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma enfermidade onde ocorre o crescimento desordenado (maligno) das células, capazes de invadir os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para diferentes regiões do corpo. Existem diversas alternativas para seu tratamento, como quimioterapia, terapia hormonal, cirurgia, transplante de medula óssea, radioterapia e terapia-alvo (INCA, 2018). A ciclofosfamida (CF) é um agente alquilante altamente usado para o tratamento de neoplasias malignas (BURKARD et al., 2014 e HUANG et al., 2014), podendo também ser utilizada como imunossupressor no transplante de órgãos (CETIK et al., 2015). Entretanto, sua utilização é limitada, devido a algumas reações adversas que incluem supressão da medula óssea, suscetibilidade a infecções, esterilidade e amenorreia; bem como complicações cardiovasculares (FURTS et al., 2011)

Estudos relacionados ao uso de probióticos – microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (ANVISA, 2002) – tem mostrado dados promissores, como eficácia na redução de colesterol em pacientes que consomem dietas ricas com o mesmo, uma vez que probióticos podem desempenhar papel expressivo no sistema digestivo, imunológico e nas funções respiratórias (FAO, 2006), inclusive em pacientes imunocomprometidos pelo uso de CF (SALVA et al., 2014). *Pichia pastoris*, uma levedura utilizada como sistema de expressão de proteínas recombinantes, vem se destacando ao ser avaliada quanto ao seu potencial probiótico (GIL DE LOS SANTOS et al., 2012). Tem se destacado também, pela sua capacidade de crescimento a partir de resíduos de baixo custo e meios de cultura relativamente simples, possibilitando sua produção em larga escala industrial (CREGG, 2017). Diante do exposto, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito da suplementação com a levedura *P. pastoris* sobre parâmetros bioquímicos em um modelo de imunossupressão induzida por quimioterapia com CF em camundongos *Swiss*.

2. METODOLOGIA

A levedura *P. pastoris* (X-33), suspensa em glicerol à 80% e armazenada a -20° C, foi cultivada em 1,4 L de caldo Yeast Malt (YM) e incubada por 72 h a 28°C sob agitação de 200 rpm em agitador orbital. Após o processo fermentativo, 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%). 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.

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 quatro grupos: grupo tratado com ciclofosfamida (CF); grupo suplementado com *P. pastoris* (PP); grupo tratado com ciclofosfamida e suplementado com *P. pastoris* (CF+PP); e grupo não tratado e não suplementado (C). Os animais do grupo PP e CF+PP foram suplementados diariamente por gavagem com 10^8 UFC/animal e, os grupos C e CF receberam solução salina diariamente a fim de gerar o mesmo estresse nos animais. O protocolo de imunossupressão, segundo Zuluaga et al. (2006), foi realizado nos grupos CF e CF+PP com duas doses de quimioterápico: a primeira no dia 13 (150 mg/kg) e a segunda dose no dia 16 (100 mg/kg). E, finalmente no 17º dia, foi realizada a eutanásia, onde os camundongos foram anestesiados com isoflurano e submetidos ao procedimento de exsanguinação por punção cardíaca, seguindo os princípios éticos estabelecidos pelo COBEA (DOU, 2016). Foi efetuada coleta de sangue e, devido a quantidade limitada das amostras de sangue, foram realizadas somente análises bioquímicas de ureia, glicose, colesterol total e triglicerídeos, utilizando-se kits comerciais (Labtest®), conforme o protocolo do fabricante. As análises estatísticas foram realizadas no programa Graphpad Prism 6.0 através dos testes: Two-way Anova e Tukey, considerando-se o nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos, bem como seus padrões de referência (SANTOS et al., 2016 e MATIDA et al., 2015), podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1: Médias \pm desvio padrão dos parâmetros bioquímicos por grupo, de camundongos Swiss machos tratados com 250 mg/kg de ciclofosfamida (CF) e suplementados diariamente por gavagem com 10^8 UFC/animal de *P. pastoris* (PP) e valores de referência (n=29).

Parâmetros Bioquímicos	Médias dos valores encontrados nos grupos (\pm desvio padrão)				Valores de referência
	Controle	CF	PP	CF+PP	
Ureia (mg/dL)	63,58 \pm 7,79	76,50 \pm 6,80 ^{ab}	64,23 \pm 4,66	69,65 \pm 4,54	20,0-65,0*
Colesterol Total (mg/dL)	130,09 \pm 7,15	121,83 \pm 9,29	122,38 \pm 8,07	139,22 \pm 14,53 ^a	80-150**
Triglicerídeos (mg/dL)	235,57 \pm 26,07	187,11 \pm 39,01 ^a	207,43 \pm 40,13	188,44 \pm 17,48	70-150**
Glicose (mg/dL)	194,47 \pm 16,20	201,76 \pm 46,03	220,59 \pm 35,82	214,62 \pm 40,58	130-210**

^a p<0,05 (Anova); ^b C x CF p=0,0229 e PP x CF p=0,0428 (Tukey); * Matida et al. (2015); ** Santos et al. (2016).

Em ambos os grupos imunossuprimidos, os valores de ureia, um marcador da função renal, apresentavam-se acima do recomendado por MATIDA et al. (2015). Além disso, foi observada diferença significativa nos valores de ureia entre os grupos (CF, p=0,0054, Anova) sendo que estes foram significativamente maiores no grupo CF do que nos grupos C (p=0,0229, Tukey) e PP (p=0,0428, Tukey), demonstrando o efeito nocivo da CF sobre este parâmetro. Névoa et al. (2013) analisaram as características bioquímicas de leitões submetidos por 60 dias a dietas com os aditivos: probiótico *S. cerevisiae* (2000 ppm), prebiótico mananoligossacarídeo (extraído da parede celular de *S. cerevisiae*) (1000 ppm), simbiótico *S. cerevisiae* (2000 ppm) + mananoligossacarídeo (1000 ppm) e o

antibiótico avilamicina (100 ppm), e não encontraram diferenças significativas entre os grupos para nenhum dos parâmetros pesquisados (ureia, creatinina, ALT, AST, colesterol total e proteínas plasmáticas). Esses dados apoiam o evidenciado no presente estudo, onde não foi observada diferença significativa nos valores plasmáticos de ureia entre os grupos CF e CF+PP, ou seja, a levedura não foi capaz de proteger os animais dos danos deletérios gerados pelo medicamento.

Com relação ao perfil lipídico, os valores obtidos para colesterol total encontravam-se dentro da normalidade para todos os grupos avaliados. Em contraponto, conforme demonstrado na Tabela 1, os níveis séricos de triglicerídeos e glicose estavam acima do proposto por SANTOS et al. (2016) principalmente nos grupos que receberam PP e CF. Entretanto, não foi observada diferença significativa quanto aos níveis de glicose entre os grupos e, com relação aos triglicerídeos, os níveis do grupo CF foram significativamente menores do que os dos outros grupos. Já com relação aos níveis séricos de colesterol total, foi observado que houve uma interação significativa ($p=0,0214$, Anova) entre o tratamento com CF e a suplementação com o probiótico, onde as médias dos níveis dos animais do grupo CF+PP foram significativamente maiores do que as do grupo tratado com CF (Tabela 1). Em seu estudo, Núñez et al. (2014) avaliaram os marcadores sanguíneos glicose, triglicerídeos, colesterol total, LDL e HDL em camundongos BALB/c fêmeas que receberam por 60 dias 10^8 UFC/ml de *L. casei* CRL 431 adicionadas à água, após a indução de obesidade por dieta hiperlipídica (5 dias). Eles constataram que os níveis de glicose nos camundongos obesos não foram alterados pela suplementação com o probiótico, assim como no presente estudo, sendo o grupo obeso que recebeu somente o leite fermentado o único a apresentar redução significativa na concentração sérica de glicose, em comparação aos demais grupos com obesidade induzida, porém, os valores obtidos foram superiores aos encontrados no grupo controle.

4. CONCLUSÕES

Os níveis de triglicerídeos foram significativamente menores e os níveis de ureia foram significativamente maiores no grupo tratado com CF, demonstrando o efeito deletério do fármaco sobre o parâmetro ureia. Entretanto, *P. pastoris* não foi capaz de evitar o aumento da ureia gerado no modelo de imunossupressão induzida por CF, pois não foram observadas alterações significativas nos parâmetros bioquímicos ureia, glicose e triglicerídeos entre os animais tratados com CF suplementados ou não com a levedura. Já quanto aos níveis séricos de colesterol total, as médias dos níveis dos animais do grupo CF+PP foram significativamente maiores do que as do grupo CF. Entretanto, não foi possível determinar se esse aumento foi devido ao aumento do colesterol HDL ou LDL, pois não foi realizada análise fracionada deste parâmetro.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. **Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2002. Acessado em 23 ago. 2018. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br>.

CETIK, S.; ADNAN, A.; SAHINTURK, V. Protective effect of carvacrol against oxidative stress and heart injury in cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in rat. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.58, n.4, 2015.

FAO. **Probióticos em los alimentos: Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación**. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Estudio FAO Alimentación y Nutrición, Roma, 2006. Acessado em 23 agost. 2018. Disponível em <http://www.fao.org>.

FURST, DE.; TSENG, CH.; CLEMENTS, PJ.; STRANGE, C.; TASHKIN, DP.; ROTH, MD, et al. Adverse events during the Scleroderma Lung Study. **Am J Med**, v.124 (5), p 459-467, 2011.

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.

HUANG, BT.; TAN, Y.; ZHAO, WH.; ZENG, QC.; LI, BS.; CHEN, RL. How to determine bortezomib-based regimen for elderly patients with multiple myeloma: PAD versus CBd, an observational study. **J Cancer Res Clin Oncol**, v.140 (2), p 303-309, 2014.

INCA. **O que é o câncer**. Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, 2018. Acessado em 24 agos. 2018. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322.

MATIDA, E. T; ZANCANARO, A. E.; RESTEL, T. I.; GOMES, V. M. W.; BAZZANO, T.; MORI, C. M. C.; TEIXEIRA, M. A. Determinação de Parâmetros Bioquímicos e hematológicos em camundongos (*musmusculus*) do Biotério Central da UFMS. **RESBCAL**. São Paulo, v.3 n.1, p 30-35, 2015.

NÉVOA, M.L.; CARAMORI, J.G.J.; CORRÊA, G.S.S.; ARANTES, V.M.; KAMIMURA, R.; GONÇALVES, F.C.; OLIVEIRA, M.S.F.; SANTOS, A. L.; NALON, R.P. Desempenho e características bioquímicas de leitões submetidos a dietas com aditivos probióticos, prebióticos, simbióticos e antibióticos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.65, n.2, p 447-454, 2013.

NÚÑEZ, I.N.; GALDEANO, C.M.; MORENO, L.B.A.; PERDIGÓN, G. Evaluation of immune response, microbiota and blood markers after probiotic bacteria administration in obese mice induced by a high fat diet. **Nutrition**, v. 13, p 1423-1432, 2014.

SALVA, S.; MARRANZINO, G.; VILENA, J.; AGÜERO, G.; ALVAREZ, S. Probiotic *Lactobacillus* strains protect against myelosuppression and immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice. **International Immunopharmacology**, v. 22, p 209–221, 2014.

SANTOS, E. W.; OLIVEIRA, D. C.; HASTREITER, A.; SILVA, G. B.; BELTRAN, J. S. O.; TSUJITA, M.; CRISMA, A. R.; NEVES, S. M. P.; FOCK, R. A.; BORELLI, P. Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci**, São Paulo, v. 53, n. 2, p 138-145, 2016.