

SANDRA APARECIDA DOS REIS

**EFEITO DO CONSUMO DE KEFIR DE LEITE INTEGRAL SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO DE LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS INTESTINAIS EM  
RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R375e  
2015

Reis, Sandra Aparecida dos, 1990-  
Efeito do consumo de kefir de leite integral sobre o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas intestinais em ratos Wistar / Sandra Aparecida dos Reis. – Viçosa, MG, 2015. xv, 92f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Kefir. 2. Probiótico. 3. Reto - Câncer. 4. Cólon - Câncer. 5. Câncer - Prevenção. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Nutrição e Saúde. Programa de Pós-graduação em Ciência da Nutrição. II. Título.

CDD 22. ed. 616.994

SANDRA APARECIDA DOS REIS

**EFEITO DO CONSUMO DE KEFIR DE LEITE INTEGRAL SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO DE LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS INTESTINAIS EM  
RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de julho de 2015.



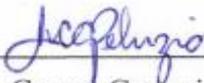
Célia Lucia de Luces Fortes Ferreira



Manoela Maciel dos Santos Dias



Sérgio Luis Pinto da Matta  
(Coorientador)



Maria do Carmo Gouveia Peluzio  
(Orientadora)

A Deus,  
Aos meus pais,  
E a todos que me ajudaram nesta caminhada,  
Dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter iluminado toda minha trajetória até aqui. E por acalmar minhas inquietações.  
Aos meus pais, José Hélio e Maria Aparecida, pelo amor, paciência, ensinamentos, conselhos, incentivo, orações, e por tornar possível minhas escolhas e desejos. Sou infinitamente grata!  
Amo vocês!

Aos meus irmãos, Edson e Emerson, pelos momentos de descontração, carinho e apoio.

Ao João Paulo, pelo amor, carinho, apoio e compreensão.

Aos meus avós, José Fonseca e Eleonor, por todo amor e carinho.

À minha orientadora, Maria do Carmo, por acreditar no meu potencial desde a graduação, pelo carinho e ensinamentos. Muito obrigada por tudo!

Aos amigos da família LABIN, Lisiane, Nathane, Mariana, Letícia, Flávia, Aline, Nando, Catarina, Manoela, Solange, Tiago, Luciana e Toninho, pela ajuda, conselhos e infinitos momentos de descontração que ajudaram e muito nesta trajetória. Muito obrigada por tudo, vocês são demais!

As amigas, Bárbara, Karla, Marynizia, Joice, Nalva e Milena, que de uma forma ou de outra contribuíram com a minha caminhada até aqui. Muito obrigada, meninas!

À irmã de coração, Deborah, pelo amor, amizade, conselhos e momentos de descontração. Muito obrigada!

À família Viana, em especial a Letícia, pelo acolhimento, carinho e amizade.

À minha querida co-orientadora, Damiana, que mesmo distante não mediu esforços para me ajudar, me aconselhando e incentivando desde o começo. Muito obrigada por tudo!

Ao Professor Sérgio da Matta, pelos ensinamentos, atenção e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

À Marli Cupertino pela ajuda e ensinamentos sempre que solicitados. Muito obrigada!

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuição científica.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Nutrição e Saúde pela oportunidade de realização deste curso.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição e Saúde, pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho.

À professora Ana Íris por abrir as portas de seu laboratório sempre que precisei. Muito obrigada!

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho.

*“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que me vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver....”*

*(Martin Luther King)*

## **BIOGRAFIA**

Sandra Aparecida dos Reis, filha de José Hélio dos Reis e Maria Aparecida da Fonseca Reis, nasceu em Viçosa-MG, em 4 de fevereiro de 1990.

Em março de 2008, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, onde cursou Nutrição, obtendo seu título de graduação em maio de 2013.

Em agosto de 2013, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição da Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de valor nutricional, funcional e controle de qualidade de alimentos e dietas.

## SUMÁRIO

|   |      |
|---|------|
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....  | viii |
| LISTA DE TABELAS .....  | x    |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....  | xi   |
| LISTA DE SÍMBOLOS .....   | xiii |
| RESUMO .....  | xv   |
| ABSTRACT .....  | xvi  |
| 1 INTRODUÇÃO GERAL .....  | 1    |
| 2 OBJETIVOS .....   | 3    |
| 2.1 Geral.....  | 3    |
| 2.2 Específicos .....   | 3    |
| 3 METODOLOGIA GERAL .....   | 4    |
| 3.1 Preparo, Avaliação Físico - Química e Microbiológica do Kefir .....   | 4    |
| 3.1.1 Preparo do Leite Fermentado: Kefir de Leite Integral.....   | 4    |
| 3.1.2 Contagem de BAL do Kefir .....  | 5    |
| 3.1.3 Contagem de Leveduras .....   | 6    |
| 3.1.4 Determinação do pH e da Acidez do Kefir .....   | 6    |
| 3.1.5 Teste de Viabilidade de BAL e Leveduras Após a Simulação das Condições<br>Prevalentes no Trato Gastrointestinal Humano..... | 7    |
| - Condição Gástrica Simulada .....  | 7    |
| - Condição Intestinal Simulada.....   | 7    |
| 3.2 Desenho Experimental .....  | 8    |
| 3.2.1 Animais.....  | 8    |
| 3.2.2 Fase Pré-Indução .....  | 8    |
| 3.2.3 Indução das Lesões Pré-neoplásicas .....  | 9    |
| 3.2.4 Fase Pós-Indução.....   | 9    |
| 3.2.5 Aspectos Éticos.....  | 10   |
| 3.3 Eutanásia e Dissecção dos Órgãos .....  | 10   |
| 3.4 Avaliação do Ganho de Peso, do Consumo Alimentar e do CEA.....  | 11   |
| 3.5 Coleta das Fezes da Gaiola .....  | 11   |
| 3.6 Teste de Permeabilidade Intestinal .....  | 11   |
| 3.7 Análises Bioquímicas .....  | 12   |
| 3.8 Contagem e Categorização dos Focos de Criptas Aberrantes .....  | 12   |

|  |    |
|--|----|
| 3.9 Extração e Dosagem dos Ácidos Graxos de Cadeia Curta .....   | 13 |
| 3.10 Análises Histológicas.....  | 13 |
| 3.10.1 <i>Processamento Histológico</i> .....  | 13 |
| 3.10.2 <i>Coloração de Alcian Blue e Ácido Periódico de Schiff</i> .....                                     | 14 |
| 3.10.3 <i>Morfometria das Criptas Colônicas</i> .....  | 14 |
| 3.10.4 <i>Contagem das Células Caliciformes PAS e AB Positivas</i> .....                                     | 15 |
| 3.11 Determinação da Concentração das Enzimas Antioxidantes no Fígado e no Cólon ....                        | 16 |
| 3.11.1 <i>Determinação da Concentração da Enzima Catalase no Fígado e no Cólon</i> .....                     | 16 |
| 3.11.2 <i>Determinação da Concentração da Superóxido Dismutase no Fígado e no Cólon</i><br>.....             | 16 |
| 3.11.3 <i>Determinação da Concentração da Glutathione-S-transferase no Fígado e no</i><br><i>Cólon</i> ..... | 17 |
| 3.12 Avaliação da Peroxidação Lipídica por TBARS no Tecido Hepático.....                                     | 17 |
| 3.13 Determinação de Proteínas .....   | 18 |
| 3.14 Análises Estatísticas.....  | 18 |
| 3.15 Referências Bibliográficas .....  | 19 |
| 4 ARTIGO I.....  | 21 |
| 5 ARTIGO II .....  | 51 |
| 6 ARTIGO III.....  | 65 |
| 7 CONCLUSÕES GERAIS .....  | 91 |
| ANEXO A – Certificado de Aprovação no CEUA/UFV .....   | 92 |

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### METODOLOGIA GERAL

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1-</b> Preparo do kefir de leite integral.....   | 5  |
| <b>Figura 2-</b> Desenho experimental.....   | 9  |
| <b>Figura 3-</b> Fotomicrografia de secção histológica da mucosa do cólon de ratos Wistar corada com AB.....   | 15 |
| <b>Figura 4-</b> Fotomicrografia de secção histológica da mucosa do cólon de ratos Wistar corada com PAS e AB e sobreposta com a grade quadrada padrão utilizada para a contagem das células caliciformes..... | 16 |

### ARTIGO I

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1-</b> Principais mecanismos utilizados pelos probióticos para inibir o desenvolvimento do câncer colorretal..... | 27 |
|---|----|

### ARTIGO II

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1-</b> Preparo do kefir de leite integral.....   | 55 |
| <b>Figura 2-</b> Sobrevivência das bactérias do ácido láctico (BAL) presentes no kefir de leite integral após exposição às condições simuladas gástricas (0 a 90 min) e intestinais (90 a 240 min) prevalentes no trato gastrointestinal humano..... | 58 |
| <b>Figura 3-</b> Sobrevivência das leveduras presentes no kefir de leite integral após exposição às condições simuladas gástricas (0 a 90 min) e intestinais (90 a 240 min) prevalentes no trato gastrointestinal humano.....                        | 59 |

### ARTIGO III

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1-</b> Desenho experimental.....   | 70 |
| <b>Figura 2-</b> Focos de cripta aberrante observados na superfície da mucosa colônica de ratos Wistar, induzidas com 1,2-dimetilhidrazina, corados com azul de metileno 0,1%..... | 71 |
| <b>Figura 3 -</b> Células caliciformes do cólon.....   | 73 |
| <b>Figura 4-</b> Peso corporal/semana dos grupos experimentais.....  | 76 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 5-</b> Perfil de AGCC (acético, propiônico e butírico) do conteúdo cecal dos animais..... | 79 |
|---|----|

**LISTA DE TABELAS****ARTIGO I**

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1-</b> Principais efeitos do consumo de alimentos e microrganismos probióticos sobre marcadores do risco de desenvolvimento de câncer colorretal em estudos experimentais..... | 24 |
| <b>Tabela 2-</b> Principais efeitos do consumo de alimentos e microrganismos probióticos sobre marcadores do risco de desenvolvimento de câncer colorretal em estudos clínicos.....      | 26 |

**ARTIGO III**

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela1-</b> Parâmetros bioquímicos.....  | 77 |
| <b>Tabela 2-</b> Efeito do tratamento com kefir sobre o número de FCA/segmento do cólon dos animais.....     | 78 |
| <b>Tabela 3-</b> Teste de permeabilidade intestinal das fases de pré e pós-indução.....                      | 80 |
| <b>Tabela 4-</b> Concentração das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GST no cólon e no fígado dos animais..... | 81 |

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AGCC - Ácidos Graxos de Cadeia Curta

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ALT - Alanina Aminotransferase

AST - Aspartato Aminotransferase

*B.* - *Bifidobacterium*

BAL - Bactérias do Acido Lático

CAT - Catalase

CCR - Câncer Colorretal

CEA - Coeficiente de Eficácia Alimentar

CLA - Ácido Linoléico Conjugado

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CTL - Controle

DMH - 1,2-dimetilhidrazina

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

DP - Desvio Padrão

*E.*- *Escherichia*

EUA - Estados Unidos da América

FCA - Foco de Cripta Aberrante

GST - Glutathione-S-Transferase

HDL - Lipoproteína de Alta Densidade

Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina

KLI - Kefir de Leite Integral

*L.* - *Lactobacillus*

LDL - Lipoproteína de Baixa Densidade

LI - Leite Integral

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MDA - Malondialdeído

NaCl - Cloreto de Sódio

NaOH - Hidróxido de Sódio

NK - *Natural Killer*

NF-κB - Fator de Transcrição Nuclear-κB

PPAR $\gamma$  - Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissomos Gama

PBS - solução salina tamponada com fosfato

RL - Radicais Livres

*S.* - *Streptococcus*

SOD - Superóxido Dismutase

TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TGF- $\beta$  - Fator de Transformação do Crescimento  $\beta$

TNF- $\alpha$  - Fator de Transcrição Nuclear  $\alpha$

ufc - Unidade Formadora de Colônia

UFV - Universidade Federal de Viçosa

**LISTA DE SÍMBOLOS**

® - Marca Registrada

↑ - Aumento

↓ - Diminuição

## RESUMO

REIS, Sandra Aparecida dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Efeito do consumo de kefir de leite integral sobre o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas intestinais em ratos Wistar.** Orientadora: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Coorientadores: Sérgio Luís Pinto da Matta, Leandro Licursi de Oliveira e Damiana Diniz Rosa.

A bebida fermentada kefir é produzida a partir da atividade metabólica de bactérias e leveduras que vivem em associação simbiótica nos grãos de kefir. O consumo regular do kefir tem sido associado a uma série de atividades terapêuticas, dentre elas a inibição do desenvolvimento tumoral. Devido às altas taxas de incidência e de mortalidade do câncer colorretal, este estudo teve como principal objetivo avaliar o efeito do consumo regular do kefir de leite integral na redução do desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas no cólon de ratos Wistar. Inicialmente, avaliamos a sobrevivência das bactérias do ácido láctico e das leveduras presentes no kefir de leite integral após a simulação *in vitro* das condições prevalentes no trato gastrointestinal humano. Posteriormente, trinta ratos Wistar foram divididos em três grupos experimentais. Nas cinco primeiras semanas, fase de pré-indução, os animais do grupo controle foram tratados com 1 mL de água destilada, o grupo leite recebeu 1 mL de leite integral pasteurizado, e o grupo kefir foi tratado com 1 mL de kefir de leite integral, via gavagem diariamente. Ao término desta fase os animais foram submetidos ao protocolo de indução das lesões pré-neoplásicas com 1,2-dimetilhidrazina. Neste momento teve início à fase de pós-indução, a qual teve duração de quinze semanas, onde os animais continuaram recebendo seus respectivos tratamentos. Assim, o experimento teve duração total de vinte semanas. Dados da simulação *in vitro* demonstraram que as leveduras presentes no kefir de leite integral são mais resistentes às condições prevalentes no trato gastrointestinal do que as bactérias do ácido láctico. Quanto à atividade anticarcinogênica do kefir, observou-se que o tratamento com o kefir foi capaz de reduzir em 36,7 % a incidência dos focos de cripta aberrante no cólon dos animais tratados em comparação ao controle ( $p < 0,001$ ). Ainda, o kefir aumentou a atividade da enzima antioxidante catalase ( $p < 0,001$ ) no cólon e a concentração dos ácidos graxos de cadeia curta nas fezes do ceco ( $p < 0,001$ ), além de reduzir a razão lactulose/manitol ( $p = 0,020$ ) ao final da fase de pós-indução. Com isto, conclui-se que a atividade anticarcinogênica do kefir de leite integral se deve à redução da permeabilidade intestinal, ao aumento da atividade antioxidante, e ao aumento da produção dos ácidos graxos de cadeia curta.

## ABSTRACT

REIS, Sandra Aparecida dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Effect of milk kefir consumption on the development of pre-neoplastic intestinal lesions in Wistar rats.** Adviser: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-advisers: Sérgio Luís Pinto da Matta, Leandro Licursi de Oliveira and Damiana Diniz Rosa.

Kefir is a fermented beverage produced from the metabolic activity of bacteria and yeasts living in symbiotic association in kefir grains. Regular consumption of kefir has been associated with a variety of therapeutic activities among them, the inhibition of tumor development. Due to high rates of incidence and mortality of colorectal cancer, this study aimed to evaluate the effect of regular consumption of whole milk kefir in the risk reduction of the development of preneoplastic lesions in Wistar rats. Initially, we evaluated the survival of lactic acid bacteria and yeasts present in whole milk kefir after *in vitro* simulation of the conditions prevailing in the human gastrointestinal tract. Subsequently, thirty Wistar rats were divided into three experimental groups. In the first five weeks, the so-called pre-induction phase, the control group was treated with 1 mL of distilled water, the milk group received 1 mL of pasteurized milk and the kefir group was treated with 1 mL of whole milk kefir, administered daily through gavage. At the end of this phase the animals were subjected to the induction protocol of preneoplastic lesions with 1,2-dimethylhydrazine. At this time it began the post-induction phase, fifteen weeks, when the animals continued to receive their treatments. Thus, the experimental lasted twenty weeks. The *in vitro* simulation data showed that the yeasts present in whole milk kefir are more resistant to the conditions prevailing in the gastrointestinal tract than the lactic acid bacteria. Regarding the anticarcinogenic activity of kefir, it was observed that treatment with kefir was able to reduce by 36.7 % the incidence of aberrant crypt foci in the colon of the treated animals compared to the control ( $p < 0.001$ ). Furthermore, kefir increased the antioxidant enzyme catalase activity ( $p < 0.001$ ) in the colon and the concentration of short-chain fatty acids in the feces of the cecum ( $p = 0.046$ ), while reducing the reason lactulose/mannitol ( $p = 0.020$ ) at the end of the post-induction phase. Thus, it was concluded that the anticarcinogenic activity of whole milk kefir is due to reduction of intestinal permeability, increased antioxidant activity, and increased production of short chain fatty acids.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O kefir é um leite fermentado acidificado, ligeiramente carbonado, que possui pequenas quantidades de álcool em sua composição. Este leite fermentado é o resultado da atividade metabólica de uma mistura específica e complexa de um conjunto de bactérias e leveduras que vivem em associação simbiótica nos grãos de kefir (LOPITZ-OTSOA et al., 2006).

Em função da diversidade microbiana, durante o processo de fermentação do kefir é produzida uma variedade de compostos bioativos, como os ácidos acético e láctico, exopolissacarídeos, peptídeos bioativos e bacteriocinas (SARKAR, 2007).

Estes compostos bioativos, juntamente com os microrganismos presentes no kefir, são os responsáveis pelas diversas atividades terapêuticas que o consumo regular deste leite fermentado proporciona aos seus consumidores (LEITE et al., 2013). Assim, o kefir pode ser considerado um alimento probiótico, uma vez que fornece microrganismos vivos, que quando ingeridos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001).

É crescente o número de estudos que avaliam o efeito da ingestão regular de probióticos na prevenção e/ou inibição do desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas no cólon (HATAKKA et al., 2008; PALA et al., 2011; MOHANIA et al., 2013; ZHU et al., 2014). Estas lesões podem dar origem ao câncer colorretal o qual apresenta altas taxas de incidência e mortalidade (HAGGAR e BOUSHEY, 2009). Portanto, estudos desse tipo são de grande interesse para a comunidade científica e para a sociedade.

Considerando que o kefir seja capaz de inibir o desenvolvimento tumoral (LIU et al., 2002; RIZK et al., 2009), é um alimento seguro, e pode ser facilmente produzido em domicílio (ROSA et al., 2014). Hipotetizou-se que o consumo regular do kefir de leite integral seria capaz de prevenir o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas induzidas quimicamente no cólon de ratos Wistar, através do aumento da atividade antioxidante colônica e hepática, do estímulo para o aumento da produção de muco pelas células caliciformes do cólon, da diminuição da permeabilidade intestinal, e do aumento da produção dos ácidos graxos de cadeia curta.

## Referências

- FAO/WHO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization**. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, 2001.
- HAGGAR, F. A.; BOUSHEY, R. P. Colorectal cancer epidemiology: Incidence, mortality, survival, and risk factors. **Clinics In Colon And Rectal Surgery**. v. 22, n. 4, 2009.
- HATAKKA, K. et al. The influence of *Lactobacillus rhamnosus* LC705 together with *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS on potentially carcinogenic bacterial activity in human colon. **International Journal of Food Microbiology**. v. 128, p. 406–410, 2008.
- LEITE, A. M. O. et al. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 44, n. 2, p. 341-349, 2013.
- LIU, J.-R. et al. Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. **Nutrition and Cancer**. v. 44, n. 2, p. 183-187, 2002.
- LOPITZ-OTSOA, F. et al. Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 23, p. 67-74, 2006.
- MOHANIA, D. et al. Anticarcinogenic effect of probiotic dahi and piroxicam on DMH-induced colorectal carcinogenesis in wistar rats. **American Journals of Cancer Therapy and Pharmacology**. v. 1, n. 1, 2013.
- PALA, V. et al. Yogurt consumption and risk of colorectal cancer in the Italian European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. **International Journal of Cancer**. v. 129, p. 2712–2719, 2011.
- RIZK, S. et al. The antiproliferative effect of kefir cell-free fraction on HuT-102 malignant T lymphocytes **Clinical Lymphoma & Myeloma**. v. 9, n. 3, p. 198-203, 2009.
- ROSA, D. D. et al. Evaluation of the subchronic toxicity of kefir by oral administration in Wistar rats. **Nutrición Hospitalaria**. v. 6, p. 1352-1359, 2014.
- SARKAR, S. Potential of kefir as a dietetic beverage – a review. **British Food Journal**. v. 1009, n. 4, p. 280-290, 2007.
- ZHU, J. et al. *Lactobacillus salivarius* Ren prevent the early colorectal carcinogenesis in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat model. **Journal of Applied Microbiology**. v., 2014.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar o efeito do consumo regular do kefir de leite integral na redução do risco do desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas no cólon de ratos Wistar.

### **2.2 Específicos**

- Revisar e discutir os principais mecanismos responsáveis pela atividade anticarcinogênica dos microrganismos probióticos;
- Avaliar a sobrevivência das bactérias do ácido lático e das leveduras presentes no kefir de leite integral após serem submetidos à simulação *in vitro* das condições prevalentes no trato gastrointestinal humano;
- Avaliar o efeito do consumo regular da bebida fermentada kefir na prevenção do desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas no cólon de ratos Wistar;
- Avaliar o efeito do consumo regular da bebida fermentada kefir na produção dos ácidos graxos de cadeia curta, na permeabilidade intestinal, na produção de diferentes tipos de mucinas pelas células caliciformes e na concentração das enzimas do sistema antioxidante.

### **3 METODOLOGIA GERAL**

#### **3.1 Preparo, Avaliação Físico - Química e Microbiológica do Kefir**

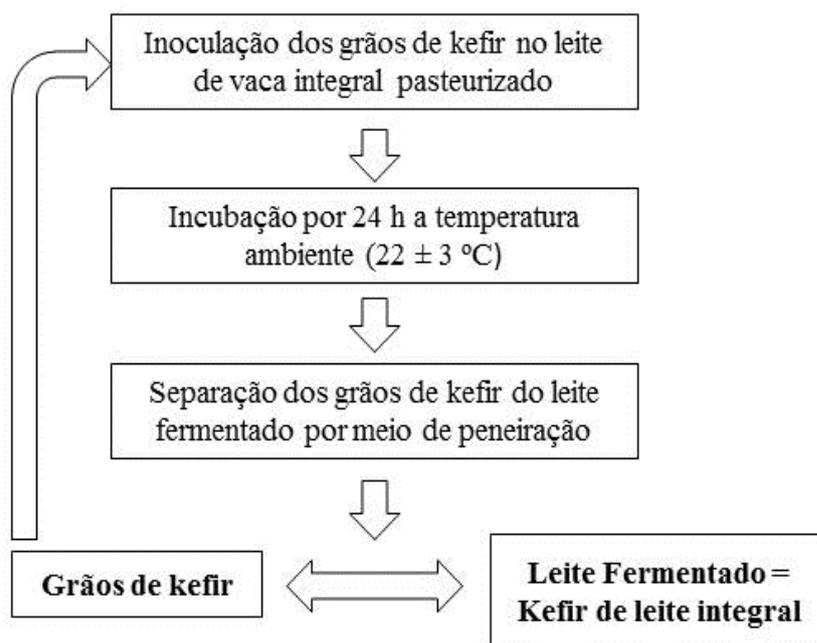
##### ***3.1.1 Preparo do Leite Fermentado: Kefir de Leite Integral***

Os grãos de kefir foram obtidos de famílias que tradicionalmente fazem o seu consumo, na região da zona da Mata Mineira, Minas Gerais, Brasil. O preparo do kefir foi realizado no Laboratório de Bioquímica Nutricional, Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Campus Viçosa-MG, onde procurou-se reproduzir as condições de preparo realizadas em domicílio.

Para o preparo do leite fermentado, inicialmente foram realizados testes, nos quais diferentes concentrações de grãos de kefir foram inoculadas no leite integral pasteurizado. Assim, padronizou-se a inoculação de 8 g dos grãos de kefir em 100 mL de leite de vaca integral pasteurizado (FUNARBE, Viçosa-MG). Este foi mantido em temperatura ambiente ( $22 \pm 3$  °C) por 24 horas, sem agitação, em recipiente de vidro previamente esterilizado, fechado com tampa, porém não hermeticamente.

Decorrida a fermentação, os grãos de kefir foram separados do leite fermentado através de peneiração. Em seguida, os grãos foram submetidos a um novo processo de fermentação, em leite integral pasteurizado para dar continuidade à produção. Doravante, o leite fermentado será denominado kefir (Figura 1).

Após a fermentação, foi realizada a contagem de bactérias do ácido láctico (BAL) e de leveduras. Dessa forma, apenas o kefir que atendia às exigências do Codex Alimentarius (CAC, 2010) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2008) foi utilizado em nossos experimentos.



**Figura 1-** Preparo do kefir de leite integral.

### **3.1.2 Contagem de BAL do Kefir**

A fim de determinar a concentração dos grãos de kefir que seriam utilizados para a produção do kefir, e monitorar a quantidade de BAL que seria oferecida diariamente aos animais, foi realizada a contagem de BAL durante diferentes momentos do experimento.

A contagem de BAL foi realizada pelo método de plaqueamento em superfície por meio da técnica de microgotas a partir de diluições decimais seriadas.

Na superfície de cada placa, contendo ágar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Acumedia<sup>®</sup>, Estados Unidos da América - EUA), foram inoculados 20 µL das diluições decimais ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ) do kefir preparado com o leite integral. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas em estufa (BOD, modelo Tecnal - TE 390, Brasil) para a contagem de unidades formadoras de colônia (ufc).

A partir da fórmula: (média final da contagem de ufc x fator de diluição)/alíquota utilizada para o plaqueamento, determinou-se a quantidade de ufc de BAL/mL de kefir.

### ***3.1.3 Contagem de Leveduras***

A contagem de leveduras foi realizada pelo método de plaqueamento em superfície por meio da técnica de microgotas a partir de diluições decimais seriadas. Na superfície de cada placa contendo ágar de batata e dextrose (BDA) (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA) acidificado com solução de 10 % de ácido tartárico, foram inoculados 20 µL das diluições decimais ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ) do kefir preparado com o leite integral. As placas foram incubadas a 28 °C em estufa incubadora (BOD, modelo Tecnal - TE 390, Brasil) durante 4 dias.

A partir da fórmula: (média final da contagem de ufc x fator de diluição)/alíquota utilizada para o plaqueamento, determinou-se a quantidade de ufc de leveduras/mL de kefir.

### ***3.1.4 Determinação do pH e da Acidez do Kefir***

O pH do kefir foi determinado com o auxílio de um pHmêtro (Instrutherm, modelo PH-1900, Brasil) previamente calibrado em temperatura ambiente (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

A acidez foi determinada de acordo com o método de acidez titulável (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). Como solução titulante utilizou-se o hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N (Vetec<sup>®</sup>, Brasil), e como indicador solução alcoólica de fenolftaleína a 1 %. A titulação foi realizada sob agitação contínua, até o ponto de viragem.

Para o cálculo da acidez titulável utilizou-se a equação:  $(V \times f \times 0,9)/M$ , onde V: volume de solução de NaOH 0,1 N gasto na titulação (mL); f: fator de correção da solução de NaOH 0,1 N; M: volume da amostra (mL). O resultado final foi expresso em porcentagem de ácido láctico/mL de kefir.

### ***3.1.5 Teste de Viabilidade de BAL e Leveduras Após a Simulação das Condições Prevalentes no Trato Gastrointestinal Humano***

#### ***- Condição Gástrica Simulada***

Durante 90 min os microrganismos do kefir de leite integral e do leite de vaca integral pasteurizado (FUNARBE, Viçosa-MG, Brasil) foram submetidos às condições gástricas simuladas *in vitro*, segundo metodologia de CONCEIÇÃO et al., (2013).

O meio para a simulação das condições gástricas (“suco gástrico”) continha 3% de pepsina (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA), 4% de mucina (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA) e 0,5% de cloreto de sódio (NaCl), com pH final ajustado para 2 com solução de ácido clorídrico 5 M. Assim, durante o teste de viabilidade 200 µL do kefir ou do leite integral foram tratados com 200 µL do “suco gástrico” (teste). Para o controle, 200 µL do kefir ou do leite integral foram tratados com 200 µL de solução tampão fosfato de sódio (PBS).

A cada 30 min, os microrganismos foram coletados por centrifugação a 7000 g a 4°C, por 5 min (Hermle<sup>®</sup>, modelo Z216MK, Alemanha). O sedimento formado com a centrifugação foi lavado com PBS pH 7,4 por duas vezes. Em seguida este foi recuperado em 400 µL de PBS, para o posterior plaqueamento em meio seletivo para a contagem de BAL (MRS ágar, Acumedia<sup>®</sup>, EUA) e leveduras (BDA ágar, Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA). Os resultados encontrados foram expressos em log ufc/mL de kefir ou leite.

#### ***- Condição Intestinal Simulada***

Após os microrganismos do kefir e do leite integral serem expostos às condições gástricas simuladas *in vitro*, estes foram submetidos *in tandem* durante 150 min às condições intestinais simuladas *in vitro*.

O meio para a simulação das condições intestinais (“suco pancreático”) continha 1 % de pancreatina (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA), 4 % de mucina (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA), 0,3 % de sais biliares (Himedia<sup>®</sup>, EUA) e 0,5 % de NaCl, com pH final ajustado para 6,8 com solução de NaOH 1,5 M (CONCEIÇÃO et al., 2013).

Assim, 200 µL do kefir ou do leite integral foram tratados com 200 µL do “suco pancreático” (teste). Para o controle, 200 µL do kefir ou do leite integral foram tratados com 200 µL de PBS.

A cada 30 min, os microrganismos foram coletados por centrifugação a 7000 g a 4°C, por 5 min (Hermle<sup>®</sup>, modelo Z216MK, Alemanha). O sedimento formado com a centrifugação foi lavado com PBS pH 7,4 por duas vezes. Em seguida este foi recuperado em 400 µL de PBS. Essa suspensão foi plaqueada em meio seletivo para a contagem de BAL (MRS ágar, Acumedia<sup>®</sup>, EUA) e leveduras (BDA ágar, Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA). Os resultados encontrados foram expressos em log ufc/mL de kefir ou leite.

## 3.2 Desenho Experimental

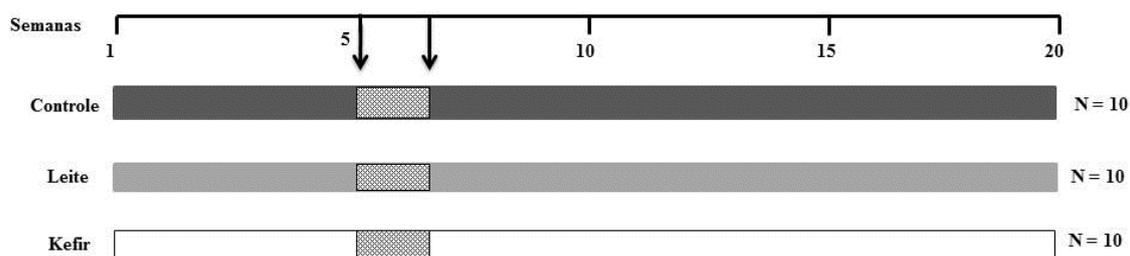
### 3.2.1 Animais

Foram utilizados trinta ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, Rodentia) provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV, com peso médio de  $225,3 \pm 3,2$  g. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura média de  $22 \pm 2$  °C. Os animais receberam água destilada e ração comercial (Presence<sup>®</sup>, Brasil) *ad libitum* por vinte semanas.

### 3.2.2 Fase Pré-Indução

Ratos Wistar, com oito semanas de vida, foram randomicamente divididos em três grupos experimentais: grupo controle (n = 10), grupo leite (n = 10) e grupo kefir (n = 10). Todos os animais receberam diariamente no período vespertino, entre as 14 e 16 h, seus respectivos tratamentos via gavagem.

Os animais do grupo controle receberam 1 mL de água destilada, o grupo leite recebeu 1 mL de leite de vaca integral pasteurizado (FUNARBE, Viçosa-MG, Brasil) e o grupo kefir recebeu 1 mL de kefir de leite integral fresco. Esta fase teve duração de cinco semanas (Figura 2).



**Figura 2-** Desenho experimental. As cinco primeiras semanas correspondem à fase de pré-indução. A região hachurada, compreendida entre as setas (2 semanas), corresponde a fase de indução das lesões pré-neoplásicas com 1,2-dimetilhidrazina, quando deu-se início a fase de pós-indução, que teve duração total de quinze semanas experimentais.

### 3.2.3 Indução das Lesões Pré-neoplásicas

Ao final das cinco semanas da fase de pré-indução foram induzidas as lesões pré-neoplásicas em todos os grupos experimentais. Para tal fim, a 1,2-dimetilhidrazina - DMH (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA), foi dissolvida em uma solução veículo de 0,9 % de NaCl contendo 1 mM de EDTA e 10 mM de citrato de sódio trifosfato, com pH final ajustado para 8,0 (LARANGEIRA et al., 1998).

Os animais receberam quatro injeções subcutâneas de DMH, na dosagem de 40 mg/kg peso corporal. Foram realizadas duas aplicações, com intervalo de 3 dias, durante duas semanas (RODRIGUES et al., 2002). Neste período, os animais continuaram recebendo os tratamentos via gavagem.

### 3.2.4 Fase Pós-Indução

Após o período de indução, os animais continuaram recebendo diariamente via gavagem 1 mL de água destilada no grupo controle, 1 mL de leite de vaca integral pasteurizado no grupo leite, e 1 mL de kefir de leite integral no grupo kefir. Esta fase teve duração de quinze semanas no total (Figura 2).

### **3.2.5 Aspectos Éticos**

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFV, número do protocolo: 84/2014 (Anexo A).

### **3.3 Eutanásia e Dissecação dos Órgãos**

A eutanásia dos animais foi realizada no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV, por uma equipe treinada e com o acompanhamento de um médico veterinário.

Foi utilizado anestésico inalatório como agente de eutanásia, em função da necessidade de coleta de sangue, como forma de minimizar os efeitos do estresse na manipulação dos animais. Após serem submetidos a um jejum de 12 horas, os roedores foram anestesiados de 3 a 5 minutos com isoflorano, a 3 % (Cristália<sup>®</sup>, Brasil), utilizando circuito simples com fluxômetro, acoplado a um cilindro de oxigênio. Os animais foram acondicionados individualmente em caixas transparentes e vedadas para saturação do anestésico, ampliando assim os efeitos aguardados da sedação e anestesia profunda. Foram avaliados parâmetros fisiológicos e reflexos para averiguação do grau de sensibilidade da anestesia para que, enfim, os animais fossem submetidos à exsanguinação total.

O sangue foi coletado por incisão na aorta abdominal e posteriormente centrifugado a 704 g por 10 minutos (Hermle<sup>®</sup>, modelo Z216MK, Alemanha). O soro foi retirado e armazenado a -80 °C para análises posteriores.

O fígado foi removido, lavado com PBS 10 mM e pesado em balança, sendo congelado a -80 °C para análises posteriores. No momento da eutanásia, foi coletado o conteúdo cecal, o qual foi armazenado à -80 °C para posteriores análises.

Aleatoriamente, o cólon de cinco animais de cada grupo foram fixados em formalina de Carson (CARSON et al., 1973) e mantidos em temperatura ambiente para contagem dos focos de cripta aberrante (FCA). O cólon dos outros cinco animais de cada grupo foi dividido em três porções, sendo que as porções proximal e distal, em relação ao ceco, foram congeladas a -80 °C, e a porção medial foi fixada em formalina de Carson (CARSON et al., 1973) para as análises histológicas.

### **3.4 Avaliação do Ganho de Peso, do Consumo Alimentar e do CEA**

O peso corporal dos animais foi verificado semanalmente. O consumo alimentar foi avaliado a partir da diferença de peso entre a quantidade de dieta ofertada e a quantidade restante não consumida somada às sobras do fundo da gaiola. O cálculo do coeficiente de eficácia alimentar (CEA) foi estabelecido pela relação entre o ganho de peso/consumo alimentar.

### **3.5 Coleta das Fezes da Gaiola**

A coleta das fezes da gaiola ocorreu três dias antes do final das fases de pré e de pós-indução. Os animais foram alocados em gaiolas metabólicas por um período de 24 h, onde tiveram livre acesso à água destilada e a ração comercial (Presence<sup>®</sup>, Brasil). Transcorridas as 24 h, as fezes presentes no fundo da gaiola foram coletadas e armazenadas a -80 °C para posteriores análises.

### **3.6 Teste de Permeabilidade Intestinal**

O teste de permeabilidade intestinal foi realizado dois dias antes do final das fases de pré e de pós-indução. Os animais foram alocados em gaiolas metabólicas, e permaneceram em jejum durante todo o procedimento. No entanto, os mesmos tiveram livre acesso à água destilada.

Nas primeiras 5 h foi coletada a urina basal. Em seguida, os animais receberam, via gavagem, 1 mL da solução de açúcares contendo 200 mg de lactulose (Lactulona<sup>®</sup>, Áustria) e 100 mg de manitol (Synth<sup>®</sup>, Brasil). Toda a urina excretada nas subsequentes 8 h foi coletada (urina teste) (MEDDINGS et al., 1999; MENDONÇA et al., 2009).

Tanto a urina basal quanto a urina teste foram quantificadas e centrifugadas a 704 g por 10 minutos (Hermle<sup>®</sup>, modelo Z216MK, Alemanha), para eliminar impurezas. As amostras foram armazenadas a -20 °C para a posterior dosagem dos açúcares.

A quantificação dos açúcares foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu<sup>®</sup>, detector modelo: RID 10A, Japão) utilizando comprimento de onda de

220 nm. Para a separação cromatográfica, 20 µL de amostra foram injetadas em uma coluna (Aminex<sup>®</sup>, modelo HPX-87H, EUA) com 300 mm x 7,8 mm de diâmetro com fluxo de 1 mL/minuto e pressão de 54 Kgf utilizou-se como fase móvel ácido sulfúrico 0,05 N/L em água.

Os resultados foram apresentados em porcentagem de excreção urinária dos açúcares, sendo também calculada a razão de excreção de lactulose/manitol (MEDDINGS et al., 1999; MENDONÇA et al., 2009).

### **3.7 Análises Bioquímicas**

O colesterol total, fração HDL-colesterol, triglicerídeos, glicose, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e creatinina foram determinados nas amostras de soro, por meio do método enzimático colorimétrico, utilizando-se kits comerciais (Bioclin<sup>®</sup>, Brasil), sendo as leituras realizadas pelo aparelho BS200. A fração LDL-colesterol foi calculada utilizando a equação de Friedewald (1972):  $LDL-c = (CT - HDL-c) - (TG/5)$ .

### **3.8 Contagem e Categorização dos Focos de Criptas Aberrantes**

Após a eutanásia, o cólon foi lavado com PBS, aberto longitudinalmente pela banda contra mesentérica, colocado em placas de parafina, com a mucosa voltada para a parte superior da placa. O colón foi fixado com formalina de Carson (CARSON et al., 1973) por 24 horas. Após a fixação, o tecido foi medido com o auxílio de uma régua e dividido em três segmentos equidistantes, que foram identificados em proximal, medial e distal em relação ao ceco.

Para a contagem dos FCA, os segmentos foram corados com solução de azul de metileno 0,1 %, durante dois minutos e lavados com PBS para a retirada do excesso do corante. A contagem foi realizada com o auxílio de um microscópio de luz (Olympus America Inc., modelo CBA, EUA) com aumento de 100X, por dois observadores. A categorização dos FCA foi realizada com base no número de criptas aberrantes por foco, sendo focos com até três ou menos criptas ( $FCA \leq 3$ ) e focos com mais de três criptas ( $FCA > 3$ ) (BIRD, 1987).

Os percentuais de redução dos FCA foram obtidos pela seguinte fórmula:  $100 - (100/\text{potência de redução})$  (PELUZIO et al., 2009), sendo a potência de redução calculada dividindo a média do número dos FCA do grupo controle pela média de FCA dos grupos leite e kefir.

### **3.9 Extração e Dosagem dos Ácidos Graxos de Cadeia Curta**

A quantificação dos AGCC foi realizada segundo metodologia proposta por SMIRICKY-TJARDES et al., (2003) adaptada. Para a extração, foram adicionados 900  $\mu\text{L}$  de ácido meta-fosfórico a 25 % (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA) às amostras do conteúdo cecal coletadas durante a eutanásia, e às fezes coletadas ao final das fases de pré ou pós-indução. Após homogeneização as amostras foram mantidas em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente.

Transcorrido este tempo as amostras foram centrifugadas a 14262 g por 30 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e submetido a mais duas centrifugações a 14262 g por 20 minutos à 4°C (Hermle<sup>®</sup>, modelo Z216MK, Alemanha).

As análises dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) acetato, propionato e butirato foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu<sup>®</sup>, detector modelo: SPD-10A VP acoplado ao detector ultra-violeta, Japão) utilizando-se um comprimento de onda de 210 nm. Para a separação cromatográfica, 20  $\mu\text{L}$  de amostra foram injetados em uma coluna (Macherey-Nagel<sup>®</sup>, modelo EC 250/4.6 nucleosil 100-5 C18, Japão) com 250 cm x 4,6 mm de diâmetro com fluxo de 0,6 mL/minuto, pressão de 65 Kgf e fase móvel 1 % de ácido orto-fosfórico em água.

### **3.10 Análises Histológicas**

#### ***3.10.1 Processamento Histológico***

Fragmentos do cólon medial de cinco animais de cada grupo foram removidos e fixados em formalina de Carson (CARSON et al., 1973) em temperatura ambiente. Após fixação os tecidos foram desidratados em gradiente crescente de etanol (70 % até absoluto), diafanizados com xilol e incluídos em Paraplast<sup>®</sup> (Sigma Aldrich, Suíça). Secções

transversais de 5 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (Olympus America InC., modelo CUT 4055, EUA).

### ***3.10.2 Coloração de Alcian Blue e Ácido Periódico de Schiff***

As secções histológicas foram submetidas às colorações de *alcian blue* (AB) e/ou ácido periódico de Schiff - PAS. Com isto, almejou-se evidenciar as células caliciformes produtoras de mucopolissacarídeo ácido, coradas com AB, na cor azul; as células caliciformes produtoras de mucopolissacarídeo neutro, coradas com PAS, na cor rósea; e as células caliciformes que produziam os dois tipos de mucopolissacarídeos, com coloração variando de azul púrpura ao violeta, que foram coradas pelos dois corantes (MCMANNUS e MOWRY, 1960).

Assim, as lâminas passaram pela bateria de pré-coloração, para a reidratação dos cortes, e em seguida foram lavadas com solução tampão de ácido acético 3 % por 5 min. A seguir foram então incubadas em solução de AB pH 2,5 por 15 min, para a coloração dos mucopolissacarídeos ácidos. Após serem novamente lavadas com solução tampão de ácido acético 3 % por 1 min, foram coradas com *fast red* 0,5 % por 3 min, para evidenciar o núcleo das células.

Para a coloração com PAS, as lâminas foram incubadas com ácido periódico durante 15 min. Após serem lavadas com água destilada, estas foram incubadas com reagente de Schiff em temperatura ambiente por 30 min, para a coloração dos mucopolissacarídeos neutros. Em seguida, foram coradas com hematoxilina de Harris por 1 min, para evidenciar o núcleo das células.

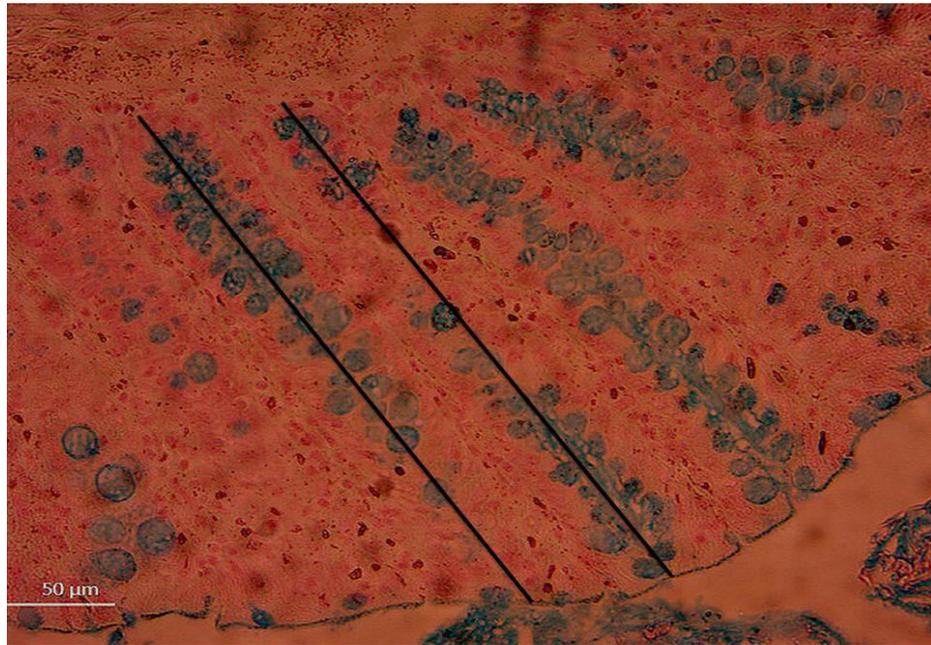
Após serem submetidas à bateria de pós-coloração, as lâminas foram secas em placa aquecedora e montadas em entellan (Merck<sup>®</sup>, Alemanha).

### ***3.10.3 Morfometria das Criptas Colônicas***

Secções histológicas selecionadas aleatoriamente de cinco animais de cada grupo foram utilizadas nas análises. Foram obtidas três lâminas/animal, cada uma contendo 10 cortes não consecutivos. De cada uma destas lâminas foram capturadas 20 imagens (2560 x

1920 pixels) totalizando 300 campos por grupo experimental. As imagens foram capturadas diretamente do microscópio de luz (Zeiss<sup>®</sup>, modelo Primo Star, Alemanha), utilizando objetiva de 20X, através de uma câmara fotográfica (Zeiss<sup>®</sup>, modelo Aix0 ERc5s, Alemanha).

A análise morfométrica foi realizada utilizando-se o *software* de análise de imagem, Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetcs Inc, EUA). Foram tomadas as medidas de 100 criptas (da base ao ápice, com aspecto retilíneo) por grupo experimental (Figura 3).

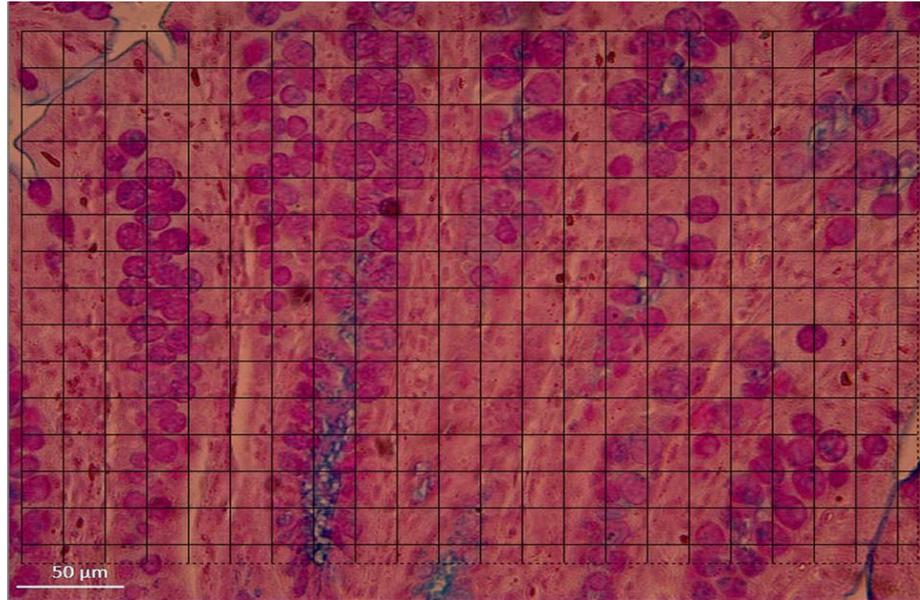


**Figura 3-** Fotomicrografia de secção histológica da mucosa do cólon de ratos Wistar corada com AB. As linhas indicam como foi realizada a medida da profundidade das criptas colônicas.

#### ***3.10.4 Contagem das Células Caliciformes PAS e AB Positivas***

A contagem das células caliciformes presentes nos campos histológicos foi realizada utilizando-se o *software* Image Pro-Plus versão 4.5 (Media Cybernetics Inc, EUA). Padronizou-se a sobreposição de uma grade quadrada padrão (35 pontos x 35 pontos) nos campos fotografados, e foram contabilizadas apenas as células caliciformes coincidentes com as interseções (Figura 4).

Assim, foi possível realizar a contagem e a categorização das células caliciformes em produtoras de mucopolissacarídeo ácido, neutro ou ambos.



**Figura 4-** Fotomicrografia de secção histológica da mucosa do cólon de ratos Wistar corada com PAS e AB e sobreposta com a grade quadrada padrão utilizada para a contagem das células caliciformes. Assim, apenas as células caliciformes coincidentes com as interseções foram contabilizadas.

### **3.11 Determinação da Concentração das Enzimas Antioxidantes no Fígado e no Cólon**

#### ***3.11.1 Determinação da Concentração da Enzima Catalase no Fígado e no Cólon***

Para determinar a atividade da catalase (CAT), uma amostra dos tecidos foi macerada com PBS 50 mM contendo Triton X-100. O homogenato resultante foi centrifugado a 1956 g a 4° C, por 10 minutos (Hermle®, modelo Z216MK, Alemanha). O sobrenadante obtido foi utilizado para mensuração da concentração enzimática, a qual foi determinada pela taxa de decaimento, durante 60 s, do peróxido de hidrogênio (Synth®, Brasil) lido em espectrofotômetro (Thermo Scientific®, modelo Multiskan GO, Finlândia) a 240nm (AEBI, 1984). A concentração da enzima foi expressa em U de catalase/mg de proteína da amostra.

#### ***3.11.2 Determinação da Concentração da Superóxido Dismutase no Fígado e no Cólon***

A concentração da superóxido dismutase (SOD) foi determinada segundo DIETERICH et al., (2000) adaptado. Basicamente, as amostras dos tecidos foram homogeneizadas com PBS 50 mM e centrifugadas a 11269 g a 4° C, por 10 minutos (Hermle®, modelo Z216MK, Alemanha). O sobrenadante resultante foi utilizado para a

mensuração da concentração da enzima, sendo as leituras realizadas em espectrofotômetro (Thermo Scientific<sup>®</sup>, modelo Multiskan GO, Finlândia), a 570 nm.

A concentração da SOD foi determinada a partir de sua habilidade de eliminar o radical livre superóxido e, conseqüentemente, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, Japão). A concentração da enzima foi expressa em U de superóxido dismutase/mg de proteína da amostra.

### ***3.11.3 Determinação da Concentração da Glutathione-S-transferase no Fígado e no Cólon***

A concentração da glutathione-S-transferase (GST) foi determinada segundo HABIG et al., (2002) adaptado. Este método baseia-se na habilidade da GST de metabolizar o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), conjugando com a glutathione reduzida (GSH).

Assim, as amostras dos tecidos foram homogeneizadas com PBS 50 mM e centrifugadas a 11269 g a 4° C por 10 minutos (Hermle<sup>®</sup>, modelo Z216MK, Alemanha). Ao sobrenadante resultante, foi acrescentado o CDNB (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA) e a GSH (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA) para a leitura em espectrofotômetro (Thermo Scientific<sup>®</sup>, modelo Multiskan GO, Finlândia) a 340 nm, durante 90 s. O coeficiente de extinção molar de 9,6 mmol/cm foi usado para calcular a concentração da GST, sendo esta expressa em nmol/min/mg de proteína da amostra.

### **3.12 Avaliação da Peroxidação Lipídica por TBARS no Tecido Hepático**

A mensuração dos metabólitos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada de acordo com metodologia proposta por BUEGE e AUST (1978). O método baseia-se na capacidade do malondialdeído (MDA), quando aquecido juntamente com o ácido tiobarbitúrico, em condições ácidas, de formar um produto de coloração rosa que pode ser mensurado por espectrofotometria.

Assim, o tecido hepático foi homogeneizado com PBS 50 mM e centrifugado a 958 g por 10 minutos (Hermle<sup>®</sup>, modelo Z216MK, Alemanha). Ao sobrenadante resultante foi acrescentada a solução que continha ácido tricloroacético (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, Brasil) e tiobarbitúrico (Merck<sup>®</sup>, Alemanha) (solução de TBARS). A reação foi mantida em banho-

maria a 100 °C por 10 minutos. Após centrifugação a 958 g por 10 minutos (Hermle<sup>®</sup>, modelo Z216MK, Alemanha), o sobrenadante foi utilizado para leitura em espectrofotômetro (Thermo Scientific<sup>®</sup>, modelo Multiskan GO, Finlândia) a 535 nm.

O coeficiente de extinção molar  $1,56 \times 10^5$  M/cm foi usado para o cálculo da concentração de TBARS no homogenato. Sendo, a concentração final expressa em micromol/mg de proteína.

### 3.13 Determinação de Proteínas

A quantidade de proteínas presentes no tecido hepático e no cólon utilizados nas análises de CAT, SOD, GST e TBARS foram mensuradas segundo metodologia de LOWRY et al., (1951). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Thermo Scientific<sup>®</sup>, modelo Multiskan GO, Finlândia) a 700 nm.

O princípio do método consiste na hidrólise alcalina das proteínas da amostra e na formação de um complexo de cor azul, a partir da reação com o reagente de Folin Ciocalteu (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA). Assim, a intensidade da coloração desse complexo é proporcional à concentração de proteína da amostra.

Para a determinação da concentração de proteínas das amostras utilizou-se uma curva padrão de proteína preparada com solução de albumina de soro bovino (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, Brasil).

### 3.14 Análises Estatísticas

A normalidade das variáveis foi determinada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As comparações entre os três grupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA *one way*) seguida do teste *post hoc* de Tukey para dados com distribuição normal.

O teste *t* pareado foi utilizado para a comparação dos resultados das fases de pré e pós-indução dentro de um mesmo grupo. Já o teste de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a presença de correlação entre as variáveis de interesse. Foi considerado um  $\alpha$  igual a 5 % ( $P < 0,05$ ). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o *software* SPSS, versão 20 para *Windows* (SPSS Inc, EUA). Para a construção dos gráficos utilizou-se o *software* GraphPad Prism, versão 6 para *Windows* (GraphPad Prism Inc, EUA).

### 3.15 Referências Bibliográficas

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods of Enzymology**. v. 105, p. 121-127, 1984.

BIRD, R. P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings **Cancer Letters**. v. 37, p. 147-151, 1987.

BRASIL. ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas, 2008. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. **In Methods of Enzymology**. New York: Academic Press, 1978. Cap. Microsomal lipid peroxidation. p. 302-310.

CAC (**Codex Alimentarius Commission**). Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex standard for fermented milks. CODEX STAN 243-2003. 2010.

CARSON, F. L. et al. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. **American Journal of Clinical Pathology**. v. 59, p. 365-373, 1973.

CONCEIÇÃO, L. L. et al. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 in fermented milk under simulated gastric and intestinal conditions. **Beneficial Microbes**. v. 4, n. 3, p. 285-289, 2013.

DIETERICH, S. et al. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: Increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**. v. 101, p. 33-39, 2000.

FRIEDWALD, R. et al. Estimation of concentration of low density lipoproteins separated by three different methods. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. v. 18, p. 499-502, 1972.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 25- 27.

LARANGEIRA, L. L. S. et al. Localização de lesões tumorais induzidas pela 1,2-dimetilhidrazina e seu grau de atipia no colon de ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**. v. 13, n. 3, 1998.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 193, p. 265-275, 1951.

MCMANNUS, J. F. A.; MOWRY, R. W. **Staining Methods. Histochemical and Histochemical**. New York: Medical Division of Harper & Brothers, 1960.

MEDDINGS, J. B. et al. Increased gastrointestinal permeability is an early lesion in the spontaneously diabetic BB rat. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**. v. 276, n. 4, p. 951-957, 1999.

MENDONÇA, J. N. et al. Padronização e validação de metodologia para verificação de permeabilidade intestinal utilizando cromatografia gasosa. **RBAC**. v. 41, n. 4, p. 271-274, 2009.

OUWEHANDA, A. C. et al. Effect of probiotics on constipation, fecal azoreductase activity and fecal mucin content in the elderly **Annals of Nutrition and Metabolism**. v. 46, p. 159-162, 2002.

PELUZIO, M. C. G. et al. Oral administration of sodium butyrate reduces chemically-induced preneoplastic lesions in experimental carcinogenesis. **Revista de Nutrição**. v. 22, n. 5, p. 717-725, 2009.

RODRIGUES, M. A. M. et al. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 34, p. 351-355, 2002.

SMIRICKY-TJARDES, M. R. et al. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentative characteristics of growing pigs. **Journal of Animal Science**. v. 81, p. 2535-2545, 2003.

#### 4 ARTIGO I

##### **Título: Probióticos na Prevenção do Câncer Colorretal: Mecanismos de Ação.**

##### **Resumo**

Nos últimos anos, maior atenção tem sido dada à composição qualitativa e quantitativa da microbiota intestinal, que passou a ser vista como mais um fator de risco dentre os múltiplos já bem estabelecidos na literatura para o desenvolvimento do câncer colorretal. Assim, o consumo de alimentos capazes de modificar de maneira positiva a composição desta microbiota, como é o caso dos probióticos, tem despertado interesse da comunidade científica. Estudos experimentais e clínicos têm mostrado que o consumo regular dos probióticos é capaz de prevenir o desenvolvimento do câncer colorretal. Alguns mecanismos têm sido apontados como os responsáveis pela atividade anticarcinogênica destes microrganismos probióticos. Até o presente momento, os principais mecanismos incluem: alterações quantitativas e qualitativas dos microrganismos que compõem a microbiota intestinal; alteração da atividade metabólica desta microbiota; ligação e degradação de compostos carcinogênicos presentes no lúmen intestinal; produção de compostos com atividade anticarcinogênica, como os ácidos graxos de cadeia curta e o ácido linoleico conjugado; imunomodulação; melhora da barreira intestinal; alteração da fisiologia do hospedeiro; inibição da proliferação celular e indução da apoptose das células tumorais. Assim, o consumo regular dos probióticos pode prevenir o desenvolvimento do câncer colorretal, através de uma diversidade de mecanismos co-dependentes e estirpe específicos.

**Palavras-chave:** câncer colorretal, probióticos, prevenção, mecanismos.

**Abstract**

In recent years, more attention has been given to qualitative and quantitative composition of the intestinal microbiota, which came as another risk factor among the many already well established in the literature for the development of colorectal cancer. Thus, food consumption able to modify in a positive manner the composition of the microbiota, such as the probiotics, has aroused the interest of scientific community. Experimental and clinical studies have shown that regular intake of probiotics can prevent the development of colorectal cancer. Some mechanisms have been identified as responsible for the anticarcinogenic activity of these probiotic microorganisms. The main mechanisms include: quantitative and qualitative changes in the composition of the microorganisms that compound the intestinal microbiota; changes in metabolic activity of the microbiota; binding and degradation of carcinogenic compounds present in the intestinal lumen; production of anticarcinogenic compounds such as short chain fatty acids and conjugated linoleic acid; immunomodulation; improvement of the intestinal barrier; alteration of host physiology; inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis of tumor cells. Thus, the regular intake of probiotics can prevent the development of colorectal cancer through a variety of strain specific and co-dependent mechanisms.

**Keywords:** colorectal cancer, probiotics, prevention, mechanisms.

## Introdução

O câncer colorretal (CCR) pode acometer toda extensão do intestino grosso e reto. Em todo o mundo, o CCR é a terceira causa de morte mais prevalente entre os diferentes tipos de câncer, sendo mais incidente nos países desenvolvidos. Estima-se que até 2035 serão diagnosticados 24,4 milhões de novos casos por ano (WHO, 2014).

Os fatores etiológicos do CCR são múltiplos, envolvem alterações genéticas e epigenéticas, além de fatores não modificáveis e ambientais. No entanto, a maioria dos casos de CCR é do tipo esporádico, no qual os fatores ambientais representam o principal fator etiológico. Dessa forma, assume-se que o CCR pode ser prevenido (HAGGAR e BOUSHEY, 2009).

Recentemente, tem sido observado que a composição qualitativa e quantitativa da microbiota intestinal constitui fator de risco para o desenvolvimento do CCR (WU et al., 2013). Acredita-se que algumas bactérias sejam capazes de dar início à carcinogênese a partir de duas vias principais, que incluem a produção de compostos carcinogênicos e a geração de um processo inflamatório crônico (SERBAN, 2014).

Dessa forma, a modificação da composição da microbiota intestinal através do consumo de probióticos poderia prevenir o desenvolvimento do CCR uma vez que estes, quando ingeridos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001; SERBAN, 2014).

Assim, estudos experimentais e clínicos (Tabelas 1 e 2) vêm sendo conduzidos a fim de avaliar o efeito do consumo de alimentos e microrganismos probióticos sobre os marcadores associados ao risco de desenvolvimento do CCR. Com isto, observa-se que os estudos experimentais têm apresentado resultados promissores com relação à atividade anticarcinogênica dos probióticos. No entanto, com relação aos estudos clínicos, os resultados são ainda controversos, uma vez que o número de estudos deste tipo é escasso.

Através de estudos experimentais e *in vitro* têm sido propostos alguns mecanismos utilizados pelos probióticos para inibir o desenvolvimento do CCR. Dessa forma, o principal objetivo desta revisão é discutir estes possíveis mecanismos.

**Tabela 1-** Principais efeitos do consumo de alimentos e microrganismos probióticos sobre marcadores do risco de desenvolvimento de câncer colorretal em estudos experimentais.

| Probiótico   | Animais   | Desenho Experimental  | Dose e Duração  | Principais Efeitos  | Referências                |
|--|---|---|---|---|----------------------------|
| Kefir de leite com diferentes concentrações de gordura (3,5 e 1,1 %)   | Ratos machos Wistar induzidos ao CCR com DMH        | A água foi substituída pelo kefir.  | -<br>7 semanas  | Kefir 3,5% de gordura: ↑ quantidade de FCA e de adenoma   | HLASTAN-RIBIC et al (2005) |
| Iogurte produzido com <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaris</i> e <i>Streptococcus thermophilus</i> | Camundongos BALB/c induzidos ao CCR com DMH         | Um grupo experimental começou o tratamento com o probiótico 10 dias antes da indução do CCR | $2 \times 10^8$ células/mL<br>5 meses                       | ↓ atividade da β-glucoronidase e da nitroreductase  | LEBLANC E PERDIGÓN (2005)  |
| <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>   | Camundongos machos Jcl:ICR induzidos ao CCR com DMH | O probiótico foi administrado via gavagem   | $10^9$ ufc/dia<br>4 semanas                                 | ↑ produção de butirato; ↓ quantidade de FCA; ↑ quantidade de células NK no baço; ↓ atividade da glucuronidase | OHKAWARA et al (2005)      |
| <i>Bacillus polyfermenticus</i>  | Ratos machos F344 induzidos ao CCR com DMH          | O probiótico foi misturado à dieta rica em gordura e pobre em fibra                         | $3,1 \times 10^8$ ufc/dia<br>10 semanas                     | ↓ 50% quantidade de FCA; ↑ potencial antioxidante total do plasma   | PARK et al (2007)          |
| <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183  | Ratos machos Wistar SPF induzidos ao CCR com DMH    | O probiótico foi administrado via gavagem   | 3 mL/kg de peso corporal/dia ( $10^8$ ufc/mL)<br>42 semanas | ↓ quantidade de FCA e de adenocarcinomas  | SIVIERI et al (2008)       |

Abreviações e símbolos: CCR: câncer colorretal, DMH: 1,2-dimetilhidrazina, FCA: focos de criptas aberrantes, *L.*: *Lactobacillus*; NK: *natural killer*, ufc: unidade formadora de colônia, ↓: diminuiu; ↑: aumentou.

| Probiótico   | Animais  | Desenho Experimental  | Dose e Duração   | Principais Efeitos   | Referências           |
|--|--|---|--|--|-----------------------|
| Produto fermentado da soja com <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183   | Ratos machos Wistar SPF induzidos ao CCR com DMH | O probiótico foi administrado via gavagem   | 3 mL/kg de peso corporal/dia (10 <sup>7</sup> ufc/mL)<br>10 semanas                            | Não alterou a quantidade de FCA  | SILVA et al (2009)    |
| Coalhada com <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> e <i>L. lactis</i> biovar. <i>Diacetylactis</i>         | Ratos induzidos ao CCR com DMH                   | A coalhada foi misturada a dieta  | 30% da dieta<br>40 semanas   | ↓ incidência, multiplicidade e tamanho dos tumores, ↓ 54,7% a quantidade de DNA danificado nos colonócitos | KUMAR et al (2010)    |
| <i>L. acidophilus</i> KFRI342  | Ratos machos F344 induzidos ao CCR com DMH       | Os animais receberam dieta hiperlipídica  | 2x10 <sup>9</sup> ufc/mL<br>10 semanas   | ↓ atividade da β-glucuronidase e da β-glucosidase; ↓ quantidade de FCA                                     | CHANG et al (2012)    |
| <i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20, <i>B. animalis</i> var. <i>lactis</i> Bb12 e <i>Saccharomyces boulardii</i> | Ratos machos Swiss induzidos ao CCR com DMH      | Avaliou o efeito isolado de cada probiótico, e a combinação de <i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20 com Bb12     | 10 <sup>8</sup> ufc/mL de cada estirpe<br>14 semanas   | ↓ quantidade de FCA  | LIBOREDO et al (2013) |
| Dahi adicionado de <i>L. acidophilus</i> LaVK2 e <i>L. plantarum</i> Lp9                                     | Ratos machos Wistar induzidos ao CCR com DMH     | 20 g do probiótico foram adicionados à dieta  | 2x10 <sup>9</sup> ufc/g de cada estirpe,<br>32 semanas   | ↓ incidência tumoral, ↓ atividade da β-glucuronidase   | MOHANIA et al, (2013) |
| <i>L. salivarius</i> Ren   | Ratos machos F344 induzidos ao CCR com DMH       | O tratamento teve início 2 semanas antes da indução do CCR. Foram usadas baixas e altas doses do probiótico | Baixa dose: 5 x 10 <sup>8</sup> ufc/kg<br>Alta dose: 1 x 10 <sup>10</sup> ufc/kg<br>15 semanas | ↓ quantidade e multiplicidade dos FCA;<br>↓ atividade da azoreductase.                                     | ZHU et al (2014)      |

Abreviações e símbolos: CCR: câncer colorretal, DMH: 1,2-dimetilhidrazina, FCA: focos de criptas aberrantes, *L.*: *Lactobacillus*; NK: *natural killer*, ufc: unidade formadora de colônia, ↓: diminuiu; ↑: aumentou.

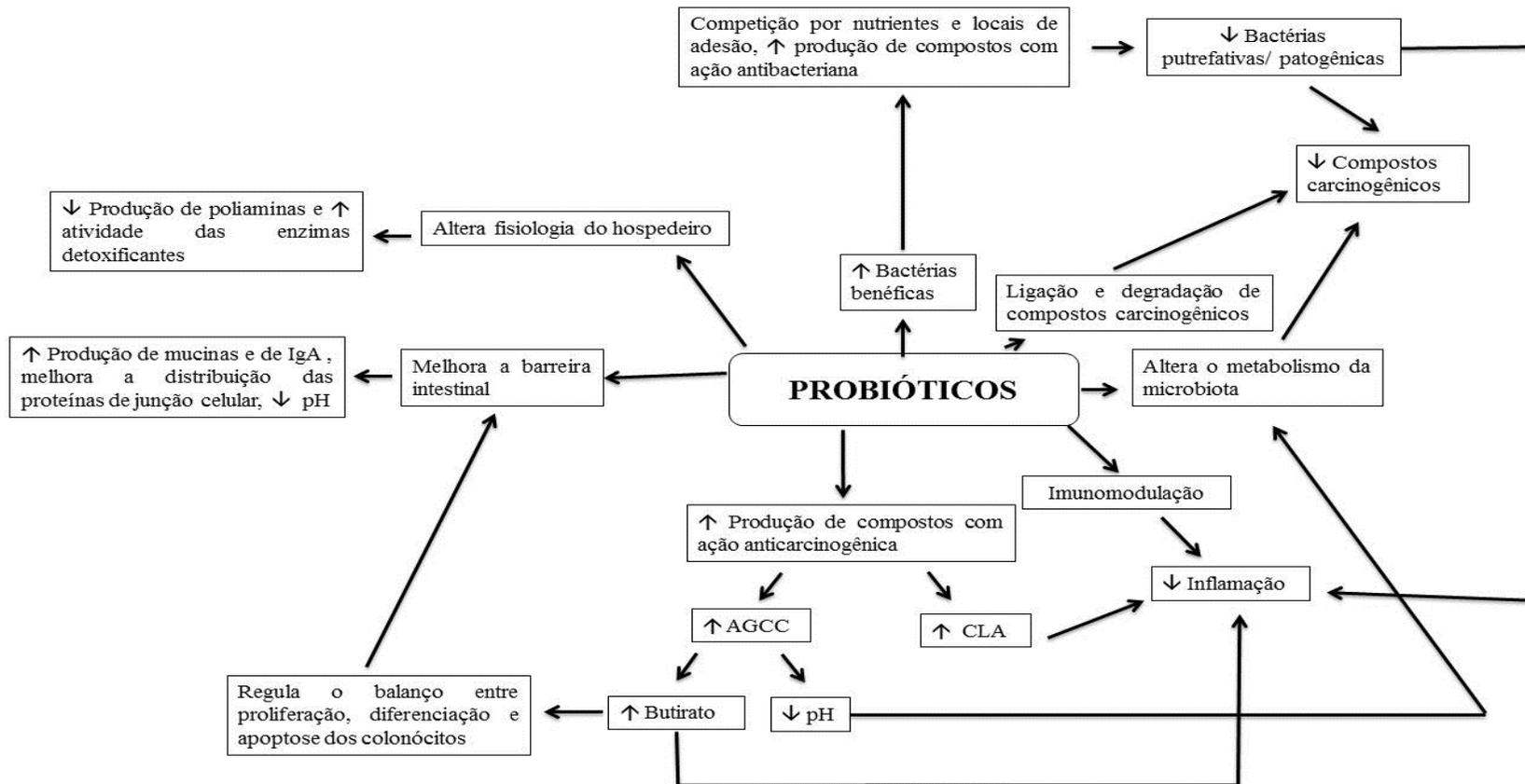
**Tabela 2-** Principais efeitos do consumo de alimentos e microrganismos probióticos sobre marcadores do risco de desenvolvimento de câncer colorretal em estudos clínicos.

| Probióticos   | Características da Amostra  | Tipo de Estudo   | Dose e Duração  | Principais Efeitos  | Referências            |
|---|---|--|---|---|------------------------|
| <i>Bioprofit</i> <sup>®</sup> ( <i>L. rhamnosus</i> LC705, <i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> JS) e <i>Rela</i> <sup>®</sup> ( <i>L. reuteri</i> ING1) | 28 idosos institucionalizados e constipados   | Randomizado, controlado com placebo, paralelo              | -<br>10 semanas   | <i>Bioprofit</i> <sup>®</sup> : ↓ atividade da azoreductase     | OUWEHAND et al, (2002) |
| <i>L. casei</i> Shirota   | 398 indivíduos que removeram pelo menos dois tumores, através de endoscopia, três meses antes do início do estudo | Randomizado, controlado com placebo, crossover             | 10 <sup>10</sup> células/g depois das refeições<br>4 anos | Preveniu o aparecimento de tumores com moderada à severa atipia | ISHIKAWA et al, (2005) |
| <i>L. rhamnosus</i> LC705 e <i>Propionibacterium freudenreichii</i> ssp. <i>hermannii</i> JS  | 38 homens com idade entre 24 e 55 anos  | Randomizado, duplo cego, controlado com placebo, crossover | 2 x 10 <sup>10</sup> ufc/dia de cada estirpe<br>4 semanas | ↓ atividade da β-glucosidase em 10% e da urease em 13%          | HATAKKA et al (2008)   |
| Iogurte produzido com <i>S. thermophilus</i> e <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>   | 45241 voluntários   | Estudo prospectivo com 12 anos de acompanhamento           | -   | ↓ risco de desenvolvimento do CCR                               | PALA et al (2011)      |

Abreviações e símbolos: CCR: câncer colorretal, *L.*: *Lactobacillus*, ufc: unidade formadora de colônia, ↓: diminuiu.

## Principais Mecanismos

Os principais mecanismos descritos na literatura científica como os responsáveis pela atividade anticarcinogênica dos probióticos estão resumidos na Figura 1.



**Figura 1-** Principais mecanismos utilizados pelos probióticos para inibir o desenvolvimento do câncer colorretal. AGCC: ácido graxo de cadeia curta, CLA: ácido linoleico conjugado, IgA: imunoglobulina A, ↓: diminuiu, ↑: aumentou.

### ***- Alterações Quantitativas e Qualitativas da Composição da Microbiota Intestinal***

Uma microbiota intestinal saudável deve ser composta de forma que a quantidade de bactérias benéficas deve exceder à quantidade de patogênicas. Caso contrário, pode ser desencadeado um processo inflamatório crônico e/ou pode haver produção de compostos com atividade carcinogênica, aumentando o risco de desenvolvimento do CCR (KAHOULI et al., 2013; KOBOZIEV et al., 2013).

Quando consumidos regularmente, os microrganismos probióticos passam a integrar a microbiota intestinal. Estes, por sua vez, são capazes de diminuir a população de bactérias patogênicas por diferentes vias, que incluem a competição por nutrientes, fatores de crescimento e receptores de adesão. Adicionalmente, alguns probióticos podem produzir algumas substâncias antibacterianas, tais como as bacteriocinas, a reuterina, o peróxido de hidrogênio e o ácido láctico, que inibem o crescimento ou eliminam as bactérias patogênicas presentes no lúmen intestinal (KAHOULI et al., 2013; SERBAN, 2014).

Tanto estudos experimentais quanto clínicos verificaram que o consumo regular dos probióticos é capaz de melhorar o perfil quantitativo e qualitativo da microbiota intestinal (LIU et al., 2011; CHANG et al., 2012; ZHU et al., 2014). De acordo com LIU et al., (2011) o consumo de probióticos (*Lactobacillus plantarum* CGMCC 1258, *Lactobacillus acidophilus* LA-11 e *Bifidobacterium longum* BL-88, na dose de  $2,6 \times 10^{14}$  ufc/dia), durante 16 dias, por indivíduos com CCR que sofreram colectomia, foi capaz de aumentar a diversidade e riqueza microbiana, de forma que a composição da microbiota intestinal destes pacientes se assemelhava a de indivíduos saudáveis.

A diminuição da população de bactérias putrefativas, como os coliformes, é importante uma vez que estas são capazes de produzir compostos carcinogênicos, além de darem início ao processo inflamatório, condições que aumentam o risco de desenvolvimento de CCR (RAFTER, 2004). Deste modo, as alterações quantitativas e qualitativas na composição da microbiota intestinal estão diretamente relacionadas com o aumento ou diminuição do risco de desenvolvimento do CCR.

### **- Alteração da Atividade Metabólica da Microbiota Intestinal**

As bactérias presentes na microbiota intestinal são capazes de produzir compostos carcinogênicos, a partir da metabolização de compostos presentes na dieta e demais compostos endógenos produzidos pelo hospedeiro, tal como os sais biliares (ZHU et al., 2013).

Esta capacidade se deve à presença e atividade de algumas enzimas encontradas nestas bactérias, como a  $\beta$ -glicosidase,  $\beta$ -glucuronidase, nitrato redutase, azoredutase, 7- $\alpha$ -dehidroxilase, que são capazes de produzir hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, ácidos biliares secundários (deoxicólico e litocólico), agliconas, fenóis, cresóis, amônia, aminas aromáticas heterocíclicas e compostos N-nitroso (UCCELLO et al., 2012). Estes metabólitos possuem atividade citotóxica e genotóxica, que pode resultar na proliferação celular desordenada e na ativação de vias antiapoptóticas nos colonócitos, contribuindo assim para o desenvolvimento do CCR (ZHU et al., 2013).

Desta forma, a alteração do metabolismo microbiano por meio da modulação da atividade destas enzimas constitui um dos mecanismos propostos pelo qual o consumo de probióticos pode reduzir o risco de desenvolvimento do CCR (UCCELLO et al., 2012). Estudos com animais e humanos demonstraram que o consumo de determinadas espécies de bactérias do ácido láctico (BAL) é capaz de diminuir a atividade destas enzimas (HATAKKA et al., 2008; CHANG et al., 2012; MOHANIA et al., 2013). No entanto, resultados discordantes também têm sido encontrados, principalmente em estudos com humanos (COMMANE et al., 2005; UCCELLO et al., 2012). Além disso, nem sempre esta diminuição é observada para todas as enzimas, sendo mais prevalente para as enzimas  $\beta$ -glucuronidase e nitrato redutase (RAFTER, 2004). Com isto, mais estudos devem ser realizados a fim de esclarecer o porquê destes diferentes resultados entre os estudos experimentais e clínicos.

As BAL, como os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, exibem baixa atividade das enzimas responsáveis pela síntese de compostos carcinogênicos quando comparadas às bactérias patogênicas, como o gênero *Clostridia*. Com o consumo regular as BAL passam a colonizar o lúmen intestinal, por meio de competição e da produção de substâncias com atividade antibacteriana. Assim, a população de bactérias patogênicas, que exibem maior atividade destas enzimas, é diminuída.

Conseqüentemente, a produção de substâncias carcinogênicas derivadas do metabolismo microbiano é reduzida (WOLLOWSKI et al., 2001).

#### ***- Ligação e Degradação de Compostos Carcinogênicos Presentes no Lúmen Intestinal***

Estudos *in vitro* e *in vivo* observaram que compostos carcinogênicos presentes no lúmen intestinal podem se ligar à parede celular de algumas bactérias probióticas. Esta capacidade parece estar associada à ocorrência de trocas catiônicas entre os compostos carcinogênicos e os peptidoglicanos e polissacarídeos presentes na parede celular dos microrganismos probióticos. Desta forma, os carcinógenos seriam eliminados juntamente com as bactérias através das fezes (BURNS e ROWLAND, 2004). Além de serem capazes de se ligar a estes compostos, alguns probióticos são capazes de metabolizá-los, principalmente os compostos N-nitrosos e aminas aromáticas heterocíclicas (UCCELLO et al., 2012).

No entanto, esta capacidade de ligação e degradação parece ser altamente dependente da estirpe utilizada, da viabilidade do microrganismo, do composto carcinogênico, da dose do probiótico utilizada, e das condições do meio, tais como pH, presença de sais biliares e enzimas (COMMANE et al., 2005). Sendo assim, questiona-se a real ocorrência desse mecanismo *in vivo*, uma vez que as condições encontradas no trato gastrointestinal poderiam afetar esse processo de modo a revertê-lo (UCCELLO et al., 2012).

Estudos experimentais e clínicos devem ser realizados a fim de esclarecer como este mecanismo acontece, como potencializar seu efeito e qual o seu real impacto na prevenção do CCR.

#### ***- Produção de Compostos com Atividade Anticarcinogênica***

Os microrganismos probióticos são capazes de produzir compostos com atividade anticarcinogênica como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), ácido linoleico conjugado (CLA) e outros compostos com atividade antioxidante, derivados

de compostos presentes na dieta como os peptídeos bioativos (KAHOULI et al., 2013). Por serem de natureza diferente, estes compostos exercem a atividade anticarcinogênica de modo peculiar, como será discutido a seguir.

### Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC)

Os AGCC são o resultado final da fermentação bacteriana de carboidratos não digeríveis provenientes da dieta e de origem endógena, como o muco. Estima-se que sejam produzidos de 100 a 450 mmol de AGCC diariamente no intestino humano, sendo a proporção molar aproximada de 60:25:15 para acetato, propionato e butirato, respectivamente (VIPPERLA e O'KEEFE, 2012).

O butirato é o AGCC mais estudado quando se trata de CCR, uma vez que auxilia na regulação do balanço entre proliferação, diferenciação e apoptose dos colonócitos (SERBAN, 2014). WEIR et al (2013) observaram que o butirato se encontrava significativamente em maiores quantidades nas fezes de indivíduos saudáveis em comparação com indivíduos com CCR. Portanto, este AGCC desempenha um papel protetor no desenvolvimento deste tipo de câncer.

Estima-se que sejam produzidos diariamente 200 mmol de butirato no intestino grosso humano. No entanto, a sua concentração diminui progressivamente à medida que se avalia da região cecal em direção ao cólon descendente, uma vez que ao longo do percurso o mesmo é rapidamente absorvido pelos colonócitos. Além disso, no cólon descendente a produção é pequena devido à baixa disponibilidade de substrato (KUMAR, et al., 2012a).

A produção de butirato é dependente da composição da microbiota intestinal, da composição química e da quantidade dos substratos utilizados no processo de fermentação, e da presença de outros metabólitos (IRRAZÁBAL et al., 2014). As bactérias produtoras de butirato pertencem aos *clusters* de Clostridia XIVa e Firmicutes IV, sendo as principais espécies produtoras *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale* e *Roseburia* (VIPPERLA e O'KEEFE, 2012). As BAL não são produtoras de butirato, mas algumas espécies de bactérias como a *Eubacterium hallii* e *Anaerostipes caccae* são capazes de converter acetato e lactato em butirato, contribuindo para a saúde intestinal (COMMANE et al., 2005; WEIR et al., 2013).

De modo geral, o butirato contribui para a prevenção do CCR, pois é capaz de melhorar a barreira intestinal, uma vez que aumenta a produção de muco e a proliferação de células saudáveis, já que é o principal substrato energético dos colonócitos. Atua ainda estimulando a produção de fatores de crescimento e de citocinas anti-inflamatórias, como interleucina (IL) -10. Também possui a capacidade de diminuir a produção das citocinas inflamatórias, através da inibição da ativação do fator de transcrição nuclear (NF) - $\kappa$ B; do aumento da imunogenicidade das células neoplásicas; da regulação da atividade de proteínas envolvidas no processo apoptótico, como Bcl-2, Bak, e caspases 3 e 7; do aumento da atividade da enzima antioxidante glutathione-S-transferase; da supressão da atividade da cicloxigenase-2; do estímulo à produção de peptídeos antimicrobianos; e da inibição da desacetilação das histonas (VIPPERLA e O'KEEFE, 2012; SERBAN, 2014).

Em um estudo experimental no qual os animais foram induzidos ao CCR com 1,2-dimetilhidrazina (DMH), observou-se que o tratamento com probiótico (*Lactobacillus salivarius* Ren; dose baixa:  $5 \times 10^8$  ufc/kg; dose alta:  $1 \times 10^{10}$  ufc/kg, durante 15 semanas) foi capaz de aumentar a quantidade de AGCC totais e de butirato nas fezes. Ainda nestes animais, a incidência dos focos de cripta aberrante (FCA) no cólon foi significativamente diminuída (ZHU et al., 2014). No entanto, FEMIA et al (2002) observaram que o tratamento com probiótico (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *rhamnosus* e *Bifidobacterium lactis* Bb12 na dose diária de  $5 \times 10^8$  ufc de cada estirpe/g de dieta, durante 31 semanas) não foi capaz de diminuir a quantidade de adenomas no cólon. Associado a isto, constatou-se que o tratamento não foi capaz de alterar a quantidade de AGCC totais nas fezes.

Quanto ao ácido acético e propiônico, estes também exibem atividade anti-inflamatória. Similar ao ácido butírico esses dois AGCC são capazes de suprimir a ativação do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B, além de regular a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (TEDELIND et al., 2007). O ácido propiônico também é capaz de estimular a apoptose das células tumorais e exibe atividade antiproliferativa. Além disso, depois do butirato, o ácido propiônico é o segundo AGCC preferencialmente utilizado pelos colonócitos como substrato energético (HOSSEINI et al., 2011).

Os AGCC são naturalmente produzidos pelas bactérias que compõem a microbiota intestinal, no entanto a quantidade produzida pode não ser suficiente para

inibir o desenvolvimento do CCR. Dessa forma, o consumo de alimentos e microrganismos probióticos contribui para o aumento do fornecimento diário dos AGCC. Os probióticos podem ainda, ser ofertados juntamente com os prebióticos os quais, ao servirem de substrato para os microrganismos da microbiota intestinal, aumentarão a produção dos AGCC.

### **Ácido Linoleico Conjugado (CLA)**

Algumas espécies de bactérias probióticas como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Propionibacterium freudenreichii*, e todas as estirpes presentes no probiótico VSL#3 (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus salivaris* subsp *thermophilus*), são capazes de produzir o CLA a partir do ácido linoleico. O CLA é produzido na região distal do íleo, e pode ser absorvido pelas células epiteliais, ou pode interagir com os colonócitos no lúmen intestinal, exercendo localmente seus efeitos benéficos (EWASCHUK et al., 2006).

As atividades antiproliferativa e pró-apoptótica do CLA são consequência de sua capacidade de aumentar a expressão do receptor ativado por proliferadores de peroxissomos gama (PPAR $\gamma$ ), o qual está envolvido nos processos de modulação do metabolismo lipídico, apoptose e funcionamento do sistema imune. Além disso, o CLA é capaz de suprimir a produção de eicosanoides nos colonócitos através de duas vias. A primeira via consiste na substituição do ácido araquidônico pelo CLA nas membranas celulares. A segunda via é consequência da interferência do CLA na atividade das enzimas cicloxigenase e lipoxigenase (BASSAGANYA-RIERA et al., 2012).

EWASCHUK et al., (2006) observaram que o CLA produzido pelas estirpes de bactérias presentes no VSL#3 foi capaz de induzir a apoptose e reduzir a viabilidade das células neoplásicas HT-29 e Caco-2. Em estudo *in vivo* com camundongos induzidos à doença inflamatória intestinal e tratados com VSL#3 ( $1,2 \times 10^{12}$  de bactérias/dia) durante 68 dias, observou-se que estes expressavam maiores quantidades de PPAR $\gamma$  no tecido colônico. Além disso, estes apresentaram menores quantidades de adenomas e

adenocarcinomas do que os animais do grupo controle (BASSAGANYA-RIERA et al., 2012).

A atividade anticarcinogênica do CLA é dose dependente, portanto, o consumo de probióticos que aumentem a produção deste ácido graxo, aumenta as chances do consumo de uma quantidade suficiente para que esta atividade anticarcinogênica possa ser exercida (EWASCHUK et al., 2006).

### ***- Imunomodulação***

A inflamação consiste de uma reação de defesa do nosso organismo contra um fator de injúria. Todo o processo é rigorosamente controlado de modo que, com a eliminação do fator de injúria, a resposta imune é finalizada e tem início a restauração dos tecidos danificados (HAKANSSON e MOLIN, 2011). No entanto, a ocorrência de inflamação crônica no intestino aumenta o risco de desenvolvimento do CCR. Tem-se como exemplo que indivíduos com doença inflamatória intestinal possuem cinco vezes mais chance de desenvolverem CCR, quando comparado com indivíduos saudáveis (BOLEIJ e TJALSMA, 2012)

A microbiota intestinal é indispensável para a maturação do sistema imune e para o desenvolvimento da tolerância imunológica pelo qual o sistema imune é modulado, de modo a proteger o organismo contra patógenos e evitar respostas imunes desnecessárias contra os microrganismos benéficos presentes no intestino (KOBOZIEV et al., 2013).

O estado inflamatório crônico pode influenciar a composição da microbiota intestinal, aumentando seu potencial genotóxico, o que denota a existência de uma forte relação entre microbiota intestinal, sistema imune e o CCR (ARTHUR et al., 2012; IRRAZÁBAL et al., 2014).

Em função disto, o uso de probióticos com a finalidade de modular o sistema imune é crescente (KOBOZIEV et al., 2013). A imunomodulação acontece quando os probióticos estimulam o sistema imune e contribuem para a manutenção do estado de vigilância do mesmo (HLASTAN-RIBIC et al., 2005). Isto possibilita a eliminação das células neoplásicas nos estágios iniciais do desenvolvimento. Assim, acredita-se que os probióticos possam ser utilizados na prevenção do desenvolvimento do CCR.

A imunomodulação acontece por meio da interação das células do sistema imune, presentes no trato gastrointestinal, com os probióticos, através do reconhecimento do microrganismo ou de seus produtos, pelos receptores das células imunes e das células epiteliais, como a família de receptores do tipo *Toll-like* e *NOD-like* (CORTHÉSY et al., 2007; DELCENSERIE et al., 2008).

Após a interação com o antígeno, as células imunes e epiteliais passam a secretar citocinas, que são essenciais para a regulação da resposta imune inata e adaptativa (DELCENSERIE et al., 2008). No caso do CCR, as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-17, IL-12, e o fator de transcrição nuclear (TNF) - $\alpha$  podem estar associados com o desenvolvimento deste tipo de câncer e, por outro lado, IL-10 e o fator de transformação de crescimento (TGF) - $\beta$  apresentam efeito inibitório (ZHU et al., 2013). Uma das vias pelas quais os probióticos conseguiriam modular a resposta imune seria por meio do aumento da produção das citocinas anti-inflamatórias e da diminuição da produção das pró-inflamatórias (URBANSKA et al., 2010).

Adicionalmente, os probióticos podem diminuir a expressão da enzima cicloxigenase-2, responsável por catalisar a produção de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico, que tem sido associada ao aumento do risco de desenvolvimento de CCR, uma vez que estimula a proliferação celular e o processo pró-inflamatório (URBANSKA et al., 2010).

Outra importante via de imunomodulação é o aumento da produção da imunoglobulina A (IgA). Devido a sua capacidade de resistência a proteólise, esta atua na barreira intestinal, limitando o contato de possíveis compostos carcinogênicos presentes no lúmen intestinal com os colonócitos (CORTHÉSY et al., 2007). Além disso, a IgA cria um ambiente anti-inflamatório, por ser incapaz de ativar o sistema complemento e respostas pró-inflamatórias (ISOLAURI et al., 2001).

Estudos com modelos animais saudáveis tratados com probióticos constataram um aumento da quantidade de IgA presente na mucosa intestinal e dos plasmócitos (VINDEROLA, PERDIGÓN, et al., 2006; GALDEANO e PERDIGÓN, 2007). No entanto, este efeito sobre a produção de IgA não foi observado em ratos induzidos ao CCR e tratados com diferentes doses de *Bifidobacterium longum* BCRC 910051, durante 15 semanas (FOO et al., 2011).

Além desses mecanismos, alguns probióticos podem também influenciar a resposta imune através da ativação dos fagócitos, os quais auxiliam na eliminação das

células neoplásicas (DELCENSERIE et al., 2008). É o caso do probiótico utilizado por VINDEROLA et al (2006), que concluíram que as frações líquidas e sólidas do kefir são capazes de estimular a atividade dos fagócitos presentes nas placas de Peyer e no peritônio dos animais tratados. Mesmo estando estimuladas, estas células não causaram danos teciduais. Assim é provável que o consumo do kefir mantenha o estado de vigilância do sistema imune, o que é indispensável para o combate ao desenvolvimento das neoplásias.

A atividade imunomodulatória dos probióticos é dependente da capacidade de sobrevivência e persistência do mesmo no trato gastrointestinal, bem como da variedade, dose e frequência utilizada, e de seu modo de interação com o sistema imune do hospedeiro (DELCENSERIE et al., 2008). Logo, nem todos os probióticos são capazes de modular o sistema imune e, conseqüentemente, prevenir a ocorrência do CCR (CORTHÉSY et al., 2007). Segundo GALDEANO et al., (2007) seria necessária uma dose diária de  $10^8$  à  $10^9$  ufc/dia para que as bactérias probióticas possam exercer sua atividade imunomodulatória, e um tempo de permanência no intestino entre 48 a 72 horas, para induzir a imunoestimulação.

#### ***- Melhora da Barreira Intestinal***

No cólon tem-se a chamada barreira intestinal, a qual tem como principal função proteger nosso organismo de danos físicos e químicos, bem como da invasão dos microrganismos presentes no lúmen intestinal (KAHOULI et al., 2013). Esta barreira é composta por uma camada de células epiteliais (colonócitos), algumas células do sistema imune, células caliciformes e de Paneth, proteínas de junção celular, camadas de muco, IgA, pH, peptídeos antimicrobianos, e os próprios microrganismos que compõem a microbiota (SCHWABE e JOBIN, 2013).

A relação simbiótica entre os microrganismos que compõem a microbiota intestinal e nosso organismo é dependente da existência desta separação anatômica. Qualquer perturbação na barreira aumenta a interação da microbiota com o hospedeiro, o que pode levar a inflamação crônica e, conseqüentemente, ao desenvolvimento do CCR. No entanto, a carcinogênese e a inflamação podem ter início sem alterações

prévias na barreira intestinal, sendo esta modificada posteriormente, contribuindo para a progressão dos processos inflamatório e carcinogênico (SCHWABE e JOBIN, 2013).

Alguns microrganismos presentes na microbiota intestinal podem alterar a barreira intestinal, de modo que esta se torne mais ou menos permeável. Assim, sabe-se que algumas espécies de probióticos são capazes de diminuir a permeabilidade intestinal, devido à melhora da barreira intestinal (KAHOULI et al., 2013). A seguir discutiremos como os microrganismos probióticos alteram alguns dos componentes da barreira intestinal.

### **pH Intracolônico**

A diminuição do pH intracolônico tem sido associado a menor ocorrência do CCR. OHIGASHI et al., (2013) observaram que indivíduos com CCR apresentavam maiores valores de pH fecal em comparação com indivíduos saudáveis. Este resultado foi atribuído à baixa quantidade de ácidos orgânicos e de AGCC encontrados nas fezes dos indivíduos com CCR.

Baixos valores de pH inibem a proliferação de bactérias patogênicas e putrefativas, além de inibir a atividade de enzimas bacterianas produtoras de compostos carcinogênicos (SIVIERI et al., 2013).

Além de contribuírem para a diminuição do pH, os ácidos láctico e acético, aumentam o peristaltismo, dificultando a adesão das bactérias patogênicas aos colonócitos e, conseqüentemente, reduzem o tempo de contato de compostos carcinogênicos com a mucosa intestinal (LIU et al., 2006). CHANG et al., (2012) atribuíram a baixa contagem de *Escherichia coli* e de bactérias aeróbicas ao baixo pH colônico presente em ratos F344 tratados com *Lactobacillus acidophilus* KFRI342 ( $2 \times 10^9$  ufc/mL) durante 10 semanas.

## Proteínas de Junção Celular

Os processos carcinogênico e inflamatório aumentam a permeabilidade intestinal paracelular, uma vez que alteram a estrutura e a expressão das proteínas que compõem as junções oclusivas (*tight junctions*), as quais são uma das responsáveis pela adesão célula a célula dos colonócitos (OHLAND e MACNAUGHTON, 2010; BOLEIJ e TJALSMA, 2012).

As junções oclusivas são os complexos de proteínas mais bem caracterizados e estudados com relação ao efeito dos probióticos sobre a permeabilidade intestinal (OHLAND e MACNAUGHTON, 2010). Estas se encontram somente na região apical entre os colonócitos. São formadas por um complexo de proteínas transmembrana, ocludinas e claudinas, que se ligam ao citoesqueleto das células epiteliais através das proteínas de junção transmembrana, as denominadas zônulas de oclusão (OHLAND e MACNAUGHTON, 2010; BOLEIJ e TJALSMA, 2012).

Os probióticos podem contribuir para a diminuição da permeabilidade intestinal, uma vez que alteram a distribuição das proteínas de junção celular (KARCZEWSKI et al., 2010; MADSEN, 2012). Dessa forma, a quantidade de compostos carcinogênicos e com potencial inflamatório absorvidos é diminuída, prevenindo a ocorrência de danos aos colonócitos e o desenvolvimento do CCR.

Em estudo clínico o tratamento com uma mistura de probióticos (*Lactobacillus plantarum* CGMCC 1258, *Lactobacillus acidophilus* LA-11 e *Bifidobacterium longum* BL-88, na dose de  $2,6 \times 10^{14}$  ufc/dia) durante os períodos pré-operatório e pós-operatório em indivíduos com CCR, foi capaz de diminuir a permeabilidade intestinal nestes indivíduos em comparação com o grupo placebo. O tratamento com o probiótico foi capaz de aumentar a quantidade das proteínas de junção celular, claudina, ocludina e JAM-1, nos indivíduos com CCR, além disso, melhorou a distribuição destas proteínas ao longo do epitélio colônico, uma vez que estas apresentavam uma distribuição mais contínua no grupo tratado com o probiótico em comparação com o placebo (LIU et al., 2011).

## Mucinas

O cólon é revestido por duas camadas de muco, sendo que a primeira se encontra fortemente ligada aos colonócitos, possui de 50 a 200  $\mu\text{m}$  de espessura, e não é habitada por bactérias da microbiota. A segunda camada pode ser removida facilmente, uma vez que não está ligada aos colonócitos e apresenta-se estruturalmente mais frouxa do que a primeira. Isto acontece devido a maior susceptibilidade desta camada a ação de enzimas proteolíticas presentes no lúmen. Ainda, por ser mais frouxa, esta camada atua como nicho para algumas bactérias (HANSSON, 2012).

O processo carcinogênico diminui a produção das mucinas e altera a composição das mesmas, de forma que passam a ser produzidas mucinas menos glicosiladas (BOLEIJ e TJALSMA, 2012). Isto permite maior contato dos compostos carcinogênicos e das bactérias intestinais com os colonócitos, o que contribui para o desenvolvimento do processo inflamatório e acelera o desenvolvimento do CCR.

Ao contrário do que inicialmente se pensava, a barreira formada pelo muco é dinâmica, sendo que a composição e a quantidade de mucinas produzidas são influenciadas pela composição da microbiota intestinal (CARASI et al., 2014). Assim, alguns probióticos são capazes de aumentar a produção das mucinas pelas células caliciformes, através da estimulação da expressão dos genes MUC, principalmente MUC 2 (KAHOULI et al., 2013).

Dessa forma, o probiótico #VSL3 ( $3 \times 10^9$  ufc/dia) foi capaz de aumentar em 60 % a produção de muco e em cinco vezes a expressão de MUC 2, no cólon de ratos Wistar saudáveis tratados durante 7 dias. Porém, o aumento da produção de mucinas ocorreu sem o aumento do número de células caliciformes no cólon dos animais (CABALLERO-FRANCO et al., 2007).

Por outro lado, GAUDIER et al, (2005) observaram que o tratamento com #VSL3 ( $4 \times 10^9$  ufc/dia) durante 14 dias não foi capaz de aumentar a expressão do gene MUC e a espessura da camada de muco no intestino de camundongos BALB/c induzidos à colite crônica, com dextrano sulfato de sódio.

A capacidade dos probióticos de aumentar a produção das mucinas pode ser influenciada por outros fatores, tais como o sistema imune e a dieta, o que pode justificar a controvérsia entre os estudos. Ainda, estudos experimentais e clínicos que

avaliaram o efeito dos probióticos sobre as mucinas de indivíduos com CCR são escassos na literatura científica.

### ***- Alteração da Fisiologia do Hospedeiro***

Os probióticos podem causar algumas alterações na fisiologia do hospedeiro, as quais podem contribuir para a prevenção do CCR. Por exemplo, alguns microrganismos probióticos tem se mostrado capazes de alterar a atividade de algumas enzimas envolvidas nos processos de detoxificação celular, tais como catalase, superóxido dismutase, glutathione-S-transferase e citocromo P450 redutase, prevenindo a ação dos radicais livres (RL) e de substâncias carcinogênicas (RAFTER, 2004).

Os RL são produzidos naturalmente durante os processos de respiração celular e inflamatório, e pela microbiota intestinal. A produção de RL pela microbiota intestinal é expressiva e capaz de exercer atividade carcinogênica (ZHU et al., 2013; IRRAZÁBAL et al., 2014). Desta forma, o cólon é susceptível aos efeitos deletérios destes compostos devendo, portanto, possuir um sistema detoxificante ativo e eficiente.

KUMAR et al., (2012b) concluíram que o efeito anticarcinogênico do *Lactobacillus plantarum* AS1 é consequência de suas propriedades antioxidantes. Estes autores observaram que a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione-S-transferase (GST) aumentaram nos animais tratados com o probiótico. Também, o leite fermentado Dahi adicionado de *Lactobacillus acidophilus* LaVK2 e *Lactobacillus plantarum* Lp9 foi capaz de aumentar a atividade da GST no fígado e no cólon dos animais tratados ( $2 \times 10^9$  ufc/g de cada estirpe, durante 32 semanas). Estes animais também apresentaram redução na quantidade dos produtos da peroxidação lipídica no cólon e no fígado, e uma menor incidência de tumores no cólon (MOHANIA et al., 2013).

A enzima GST além de antioxidante possui atividade desintoxicante. Esta enzima faz parte do grupo de enzimas da fase II do processo de biotransformação, no qual esta é capaz de inativar compostos carcinogênicos que foram absorvidos pelo organismo. Acredita-se que os probióticos consigam aumentar a atividade desta enzima através da ação do ácido butírico. Este, ao alterar o estado de acetilação das histonas,

aumentaria a expressão da GST, com isto tem-se um aumento das atividades antioxidante e desintoxicante (POOL-ZOBEL et al., 2005).

Por sua vez, o citocromo P450 redutase faz parte das enzimas da fase I responsáveis pelos processos de biotransformação que acontecem em nosso organismo (POOL-ZOBEL et al., 2005). Acredita-se que o consumo regular de BAL seja capaz de aumentar a atividade desta enzima nos colonócitos, o que levaria a inativação dos compostos carcinogênicos que foram absorvidos (RAFTER, 2004).

Em estudo com ratos F344 alimentados com dieta contendo aminas aromáticas heterocíclicas e tratados com leite fermentado por *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 e *Streptococcus thermophilus* DN-001 158, durante 7 semanas, não foi observado aumento da quantidade e atividade do citocromo P450 redutase no cólon e no fígado. Contudo, mesmo sem alterar a atividade desta enzima, o tratamento com o leite fermentado foi capaz de reduzir a incidência dos FCA (TAVAN et al., 2002). Todavia, estudos recentes que comprovem este mecanismo são escassos.

Outra forma pela qual os probióticos alteram a fisiologia do hospedeiro diz respeito às poliaminas. As poliaminas são moléculas carregadas positivamente, capazes de se ligar às proteínas, fosfolipídios, DNA e RNA presentes no interior das células. Consequentemente, estas moléculas interferem na regulação da expressão gênica e nos processos de proliferação e diferenciação celular (MILOVIC e TURCHANOWA, 2003).

Devido as suas funções fisiológicas, as poliaminas têm sua biossíntese, catabolismo, absorção e efluxo celulares rigorosamente controlados. No entanto, com o desenvolvimento do CCR tem-se uma perda da homeostase dos níveis intracelulares destas moléculas, o que leva ao aumento da concentração das mesmas. O câncer pode levar ao aumento da biossíntese, à diminuição do catabolismo e ao aumento da captação das poliaminas pelas células. Com isto, as poliaminas podem ser utilizadas como marcadores de proliferação de neoplasias no cólon (MILOVIC e TURCHANOWA, 2003).

Ratos F344 induzidos ao CCR com azoximetano e alimentados com dieta contendo 2% de *Bifidobacterium longum* ( $4 \times 10^{10}$  células/g de dieta) durante 40 semanas, apresentaram atividade diminuída da enzima ornitina descarboxilase nas células da mucosa intestinal em comparação ao controle. Associado a este resultado, os animais tratados com o probiótico apresentaram uma menor incidência e multiplicidade

tumoral (SINGH et al., 1997). A ornitina descarboxilase é limitante para a síntese das poliaminas, e apresenta-se mais ativa nas células tumorais do que nas saudáveis, como consequência do estado hiperproliferativo (MILOVIC e TURCHANOWA, 2003).

De modo geral, estudos experimentais e clínicos atuais que avaliaram a capacidade dos probióticos de alterar a fisiologia de hospedeiros com CCR são escassos. Sendo assim, este mecanismo precisa ser mais estudado para melhor entendimento de sua ocorrência.

### ***- Inibição da Proliferação e Indução de Apoptose nas Células Tumorais***

A ocorrência dos processos de proliferação e apoptose nas células tumorais é o que define a velocidade de desenvolvimento do câncer. Em função das mutações ocorridas ao longo do processo de desenvolvimento, as células neoplásicas proliferam mais do que sofrem apoptose (FEARON, 2011). Assim, probióticos capazes de modular os processos de proliferação celular e de apoptose são de grande interesse, uma vez que, as células neoplásicas seriam eliminadas de forma menos agressiva, já que a apoptose não traz qualquer prejuízo para as células vizinhas e não causa inflamação, diferentemente do que acontece com os tratamentos quimioterápicos e radioterápicos (ORLANDO e RUSSO, 2013).

Em estudo *in vitro*, *Enterococcus faecium* RM11 e *Lactobacillus fermentum* RM28, estirpes de bactérias que podem ser encontradas nos leites fermentados, foram capazes de inibir a proliferação de células Caco-2 em 21 e 23 % respectivamente (THIRABUNYANON et al., 2009). SADEGHI-ALIABADI et al (2014) observaram que *Lactobacillus plantarum* A7 e *Lactobacillus rhamnosus* GG inativados pelo calor e o sobrenadante livre de células produzido por eles também exibe esta atividade antiproliferativa. Portanto, este efeito dos probióticos sobre as células neoplásicas independe da viabilidade do microrganismo.

*In vivo*, ratos induzidos ao CCR com DMH e tratados com diferentes doses de *Bifidobacterium longum* BCRC 910051, por 15 semanas, apresentaram diminuição no índice mitótico dos colonócitos e na proliferação celular nas criptas colônicas em comparação com o grupo não tratado. Este efeito causado pelo probiótico pode ter sido

o responsável pela diminuição de 25 a 30 % na quantidade de FCA presentes nestes animais (FOO et al., 2011).

ZHU et al (2014) constataram que o tratamento com *Lactobacillus salivarius* Ren em diferentes doses, durante 15 semanas, reduziu a proliferação celular nas criptas de ratos F344 induzidos ao CCR com DMH. O tratamento com o probiótico também foi capaz de reduzir a incidência dos FCA em aproximadamente 40 %.

O aumento da incidência de apoptose das células neoplásicas induzida pelo consumo dos probióticos tem sido atribuído aos AGCC, principalmente butirato. Este AGCC é capaz de induzir alterações epigenéticas, paralisar o ciclo celular e estimular a expressão de genes pró-apoptose (KUMAR, et al., 2012a). WORTHLEY et al, (2009) constataram que existe uma relação inversa entre a quantidade de AGCC presente nas fezes com o índice de proliferação celular nas criptas.

A imunomodulação constitui outra via que contribui para a atividade pró-apoptótica induzida pelo consumo dos probióticos, principalmente o aumento da produção de TNF- $\alpha$  (LEBLANC e PERDIGÓN, 2004). Ainda, em estudo *in vitro*, WAN et al (2014) concluíram que a capacidade de induzir a apoptose das células tumorais SW620 pelo probiótico *Lactobacillus delbrueckii*, seria consequência do aumento da expressão da caspase-3 e da redução da expressão de Bcl-2.

Assim, através da imunomodulação e do aumento da expressão de proteínas envolvidas na regulação do processo apoptótico, os probióticos conseguem inibir o desenvolvimento tumoral. No entanto, este efeito do consumo dos probióticos sobre as células neoplásicas não deve se estender aos colonócitos saudáveis, uma vez que isto levaria a disfunção da barreira intestinal, a qual como vimos anteriormente, está diretamente relacionada com o desenvolvimento do CCR.

## **Conclusões**

O consumo dos probióticos pode contribuir para a prevenção do desenvolvimento do CCR. Até o momento, as evidências científicas sugerem que tal atividade anticarcinogênica advém de mecanismos fisiológicos diversos e muitas vezes co-dependentes.

Os mecanismos utilizados pelos probióticos incluem: a alteração quantitativa e qualitativa da composição da microbiota intestinal e sua atividade metabólica; a capacidade de ligar e degradar os compostos carcinogênicos presentes no lúmen intestinal; o aumento da produção de compostos com atividade anticarcinogênica, como os AGCC e o CLA; a imunomodulação; a melhora da barreira intestinal; a alteração da fisiologia do hospedeiro; a inibição da proliferação e a indução da apoptose das células neoplásicas.

Alguns resultados contraditórios são encontrados na literatura científica com relação à atividade anticarcinogênica dos probióticos. Estas discrepâncias podem, pelo menos, em parte, ser explicadas pelo fato dos mecanismos de proteção ser estirpes específicas. Além disso, são utilizadas diferentes doses, tempos de tratamento, frequência de uso, e forma de apresentação do produto (liofilizado, microencapsulado, ou pronto pra consumo como o iogurte). Estes são alguns dos fatores que dificultam a comparação de resultados entre os estudos e conseqüentemente a extrapolação dos resultados obtidos.

Sendo assim, mais estudos devem ser conduzidos a fim de identificar os produtos com alegação de probiose e as estirpes envolvidas nos mecanismos mais efetivos na prevenção do CCR. Somado a isto, torna-se necessário também estabelecer as doses e as frequências de consumo recomendadas para se obter o efeito protetor relacionado a este tipo de câncer.

## Referências

ARTHUR, J. C. et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. **Science**. v. 338, p. 120-123, 2012.

BASSAGANYA-RIERA, J. et al. Immunoregulatory mechanisms underlying prevention of colitis-associated colorectal cancer by probiotic bacteria. **PLoS ONE**. v. 7, n. 4, 2012.

BOLEIJ, A.; TJALSMA, H. Gut bacteria in health and disease: a survey on the interface between intestinal microbiology and colorectal cancer. **Biological Reviews**. v. 87, p. 701-730, 2012.

BURNS, A. J.; ROWLAND, I. R. Antigenotoxicity of probiotics and prebiotics on faecal water-induced DNA damage in human colon adenocarcinoma cells. **Mutation Research**. v. 551, p. 233-243, 2004.

CABALLERO-FRANCO, C. et al. The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**. v. 292, p. 315–322, 2007.

CARASI, P. et al. Impact of kefir derived *Lactobacillus kefir* on the mucosal immune response and gut microbiota. **Journal of Immunology Research**. v., 2014.

CHANG, J. H. et al. Effect of *Lactobacillus acidophilus* KFRI342 on the development of chemically induced precancerous growths in the rat colon. **Journal of Medical Microbiology**. v. 61, p. 361–368, 2012.

COMMANE, D. et al. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. **Mutation Research**. v. 591, p. 276-289, 2005.

CORTHÉSY, B. et al. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. **The Journal of Nutrition**. v. 137, p. 781–790, 2007.

DELCENSERIE, V. et al. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. **Current Issues in Molecular Biology**. v. 10, p. 37-54, 2008.

EWASCHUK, J. B. et al. Bioproduction of conjugated linoleic acid by probiotic bacteria occurs *in vitro* and *in vivo* in mice. **The Journal of Nutrition**. v. 136, p. 1483-1487, 2006.

FAO/WHO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization**. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, 2001.

FEARON, E. R. Molecular genetics of colorectal cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**. v. 6, p. 479–507, 2011.

FEMIA, A. P. et al. Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. **Carcinogenesis**. v. 23, n. 11, p. 1953-1960, 2002.

FOO, N.-P. et al. Probiotics prevent the development of 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colonic tumorigenesis through suppressed colonic mucosa cellular proliferation and increased stimulation of macrophages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 59, p. 13337–13345, 2011.

GALDEANO, C. M. et al. Proposed model: Mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. **Clinical and Vaccine Immunology**. v. 14, n. 5, p. 485–492, 2007.

GALDEANO, C. M.; PERDIGÓN, G. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. **Clinical and Vaccine Immunology**. v. 13, n. 2, p. 219–226, 2007.

- GAUDIER, E. et al. The VSL# 3 probiotic mixture modifies microflora but does not heal chronic dextran-sodium sulfate–induced colitis or reinforce the mucus barrier in mice. **The Journal of Nutrition**. v. 135, p. 2753–2761, 2005.
- HAGGAR, F. A.; BOUSHEY, R. P. Colorectal cancer epidemiology: Incidence, mortality, survival, and risk factors. **Clinics In Colon And Rectal Surgery**. v. 22, n. 4, 2009.
- HAKANSSON, A.; MOLIN, G. Gut Microbiota and inflammation. **Nutrients**. v. 3, p. 637-682, 2011.
- HANSSON, G. C. Role of mucus layers in gut infection and inflammation. **Current Opinion in Microbiology**. v. 15, p. 57–62, 2012.
- HATAKKA, K. et al. The influence of *Lactobacillus rhamnosus* LC705 together with *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS on potentially carcinogenic bacterial activity in human colon. **International Journal of Food Microbiology**. v. 128, p. 406–410, 2008.
- HLASTAN-RIBIC, C. et al. Effects of kefir containing various levels of fat on chemically induced colorectal epithelial tumors in Wistar rats. **Nutrition Research**. v. 25, p. 55–63, 2005.
- HOSSEINI, E. et al. Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. **Nutrition Reviews**. v. 69, n. 5, p. 245–258, 2011.
- IRRAZÁBAL, T. et al. The multifaceted role of the intestinal microbiota in colon cancer. **Molecular Cell**. v. 54, p. 309-320, 2014.
- ISHIKAWA, H. et al. Randomized trial of dietary fiber and *Lactobacillus casei* administration for prevention of colorectal tumors. **International Journal of Cancer**. v. 116, p. 762-767, 2005.
- ISOLAURI, E. et al. Probiotics: effects on immunity. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 73, p. 444–450, 2001.
- KAHOULI, I. et al. Probiotics in colorectal cancer (CRC) with emphasis on mechanisms of action and current perspectives. **Journal of Medical Microbiology**. v. 62, p. 1107–1123, 2013.
- KARCZEWSKI, J. et al. Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* *in vivo* and protective effects on the epithelial barrier. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**. v. 289, p. 851–859 2010.
- KOBOZIEV, I. et al. Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. **Free Radical Biology and Medicine**. v., 2013.

- KUMAR, A. et al. Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine induced colon genotoxicity in rats by the administration of probiotic curd. **Molecular and Biology Reports**. v. 37, p. 1373–1376, 2010.
- KUMAR, M. et al. Probiotic metabolites as epigenetic targets in the prevention of colon cancer. **Nutrition Reviews**. v. 71, n. 1, p. 23–34, 2012a.
- KUMAR, R. S. et al. *Lactobacillus plantarum* AS1 isolated from south indian fermented food *Kallappam* suppress 1,2-dimethylhydrazine (dmh)-induced colorectal cancer in male wistar rats. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 166, p. 620–631, 2012b.
- LEBLANC, A. D.; PERDIGÓN, G. Reduction of  $\beta$ -Glucuronidase and nitroreductase activity by yoghurt in a murine colon cancer model. **Biocell**. v. 29, n. 1, p. 15-24, 2005.
- LEBLANC, A. M.; PERDIGÓN, G. Yogurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer. **Medical Science Monitor**. v. 10, n. 4, p. 96-104, 2004.
- LIBOREDO, J. C. et al. Effect of probiotics on the development of dimethylhydrazine-induced preneoplastic lesions in the mice colon. **Acta Cirurgica Brasileira**. v. 28, n. 5, p. 367-372, 2013.
- LIU, J. R. et al. The anti-allergenic properties of milk kefir and soymilk kefir and their beneficial effects on the intestinal microflora. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 86, p. 2527–2533, 2006.
- LIU, Z. et al. Randomised clinical trial: the effects of perioperative probiotic treatment on barrier function and post-operative infectious complications in colorectal cancer surgery – a double-blind study. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**. v. 33, p. 50–63, 2011.
- MADSEN, K. L. Enhancement of epithelial barrier function by probiotics. **Journal of Epithelial Biology and Pharmacology**. v. 5, p. 55-59 2012.
- MILOVIC, V.; TURCHANOWA, L. Polyamines and colon cancer. **Biochemical Society Transactions**. v. 31, p. 381-383, 2003.
- MOHANIA, D. et al. Anticarcinogenic effect of probiotic dahi and piroxicam on DMH-induced colorectal carcinogenesis in wistar rats. **American Journals of Cancer Therapy and Pharmacology**. v. 1, n. 1, 2013.
- OHIGASHI, S. et al. Changes of the intestinal microbiota, short chain fatty acids, and fecal pH in patients with colorectal cancer. **Digestive Diseases and Sciences**. v. 58, p. 1717–1726, 2013.
- OHKAWARA, S. et al. Oral administration of *Butyrivibrio fibrisolvens*, a butyrate-producing bacterium, decreases the formation of aberrant crypt foci in the colon and rectum of mice. **The Journal of Nutrition**. v. 135, p. 2878–2883, 2005.

OHLAND, C. L.; MACNAUGHTON, W. K. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**. v. 298, p. 807–819, 2010.

ORLANDO, A.; RUSSO, F. Intestinal microbiota, probiotics and human gastrointestinal cancers. **Journal of Gastrointestinal Cancer**. v. 44, p. 121–131, 2013.

OUWEHANDA, A. C. et al. Effect of probiotics on constipation, fecal azoreductase activity and fecal mucin content in the elderly **Annals of Nutrition and Metabolism**. v. 46, p. 159-162, 2002.

PALA, V. et al. Yogurt consumption and risk of colorectal cancer in the Italian European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. **International Journal of Cancer**. v. 129, p. 2712–2719, 2011.

PARK, E. et al. A probiotic strain of *Bacillus polyfermenticus* reduces DMH induced precancerous lesions in F344 male rat. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 30, n. 3, p. 569-574, 2007.

POOL-ZOBEL, B. et al. Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens - focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. **Mutation Research**. v. 591, p. 74–92, 2005.

RAFTER, J. The effects of probiotics on colon cancer development. **Nutrition Research Reviews**. v. 17, p. 277–284, 2004.

SADEGHI-ALIABADI, H. et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* A7 with probiotic potential on colon cancer and normal cells proliferation in comparison with a commercial strain. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**. v. 17, n. 10, p. 815-819, 2014.

SCHWABE, R. F.; JOBIN, C. The microbiome and cancer. **Nature**. v. 13, p. 800-812, 2013.

SERBAN, D. E. Gastrointestinal cancers: Influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. **Cancer Letters**. v. 345, p. 258-270, 2014.

SILVA, M. F. et al. Effects of a probiotic soy product and physical exercise on formation of pre-neoplastic lesions in rat colons in a short-term model of carcinogenic. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**. v. 6, n. 17, p. 1-6, 2009.

SINGH, J. et al. *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**. v. 18, n. 4, p. 833–841, 1997.

SIVIERI, K. et al. Probiotics and intestinal microbiota: Implications in colon cancer prevention. **InTech**. v., p. 217-242, 2013.

SIVIERI, K. et al. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male Wistar rats. **European Food Research and Technology**. v. 228, p. 231–237, 2008.

TAVAN, E. et al. Effects of dairy products on heterocyclic aromatic amine-induced rat colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**. v. 23, n. 3, p. 477–483, 2002.

TEDELIND, S. et al. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**. v. 13, n. 20, p. 2826–2832, 2007.

THIRABUNYANON, M. et al. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. **Biotechnology Letter**. v. 31, p. 571–576, 2009.

UCCELLO, M. et al. Potential role of probiotics on colorectal cancer prevention. **BMC Surgery**. v. 12, n. 1, p. 1–8, 2012.

URBANSKA, A. M. et al. Suppression of tumorigenesis: Modulation of inflammatory cytokines by oral administration of microencapsulated probiotic yogurt formulation. **International Journal of Inflammation**. v. 2010, p. 1–10, 2010.

VINDEROLA, G. et al. Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirianofaciens* on the gut mucosal immunity. **Cytokine**. v. 36, p. 254–260, 2006.

VINDEROLA, G. et al. Effects of kefir fractions on innate immunity. **Immunobiology**. v. 211, p. 149–156, 2006.

VIPPERLA, K.; O'KEEFE, S. J. The microbiota and its metabolites in colonic mucosal health and cancer risk. **Nutrition in Clinical Practice**. v. 27, n. 5, p. 624–635, 2012.

WAN, Y. et al. Fermentation supernatants of *Lactobacillus delbrueckii* inhibit growth of human colon cancer cells and induce apoptosis through a caspase 3-dependent pathway. **Oncology Letters**. v. 7, p. 1738–1742, 2014.

WEIR, T. L. et al. Stool microbiome and metabolome differences between colorectal cancer patients and healthy adults. **PLoS ONE**. v. 8, n. 8, 2013.

WHO. **World Health Organization**. Global health observatory: Cancer mortality and morbidity. 2014. Disponível em: [http://www.who.int/gho/ncd/mortality\\_morbidity/cancer/en/](http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en/). Acessado em: 22 de junho de 2015.

WOLLOWSKI, I. et al. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 73, p. 451–455, 2001.

WORTHLEY, D. L. et al. A human, double-blind, placebo-controlled, crossover trial of prebiotic, probiotic, and synbiotic supplementation: effects on luminal, inflammatory,

epigenetic, and epithelial biomarkers of colorectal cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 90, p. 578–586, 2009.

WU, N. et al. Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients. **Microbial Ecology**. v. 66, p. 462–47066, 2013.

ZHU, J. et al. *Lactobacillus salivarius* Ren prevent the early colorectal carcinogenesis in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat model. **Journal of Applied Microbiology**. v., 2014.

ZHU, Q. et al. The role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer. **Tumor Biology**. v. 34, p. 1285-1300, 2013.

## 5 ARTIGO II

### **Título: Sobrevivência das Bactérias do Ácido Lático e das Leveduras Presentes no Kefir de Leite Integral após Simulação In Vitro das Condições Prevalentes do Trato Gastrointestinal Humano.**

#### **Resumo**

O leite fermentado kefir é produzido a partir de uma mistura de bactérias e leveduras que vivem em associação simbiótica nos grãos de kefir. O consumo regular do kefir proporciona benefícios à saúde humana, e assim, o kefir preenche um dos pré-requisitos para ser considerado um alimento probiótico. No entanto, pouco se sabe sobre a sobrevivência destas bactérias e leveduras após a passagem pelo trato gastrointestinal humano. Dessa forma, este estudo teve como principal objetivo avaliar a sobrevivência das bactérias do ácido lático e das leveduras presentes no kefir de leite integral após estes serem submetidos à simulação *in vitro* das condições prevalentes no trato gastrointestinal humano. Durante o ensaio, alíquotas das amostras do kefir foram plaqueadas em meio seletivo para bactérias do ácido lático e para leveduras. Após o período de incubação foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia. Observamos que as bactérias do ácido lático do kefir de leite integral são altamente sensíveis às condições prevalentes no estômago, de modo que a sobrevivência das mesmas reduziu em aproximadamente cinco ciclos logarítmicos nos primeiros 30 min de ensaio. Com relação às leveduras, estas parecem ser pouco afetadas pelas condições prevalentes no trato gastrointestinal. Assim, conclui-se que as leveduras presentes no kefir de leite integral são mais resistentes às condições prevalentes no trato gastrointestinal do que as bactérias do ácido lático.

**Palavras-chave:** Kefir de leite integral, sobrevivência, trato gastrointestinal humano, *in vitro*, bactéria do ácido lático, leveduras.

**Abstract**

The fermented beverage kefir is produced from a mixture of bacteria and yeasts living in a symbiotic association in kefir grains. Regular consumption of kefir provides benefits to human health, thus kefir fills one of the prerequisites to be considered a probiotic food. However, little is known about the survival of these bacteria and yeasts after passage through the human gastrointestinal tract. Thus, this study aimed to evaluate the survival of lactic acid bacteria and yeasts present in whole milk kefir after they undergo in the simulation *in vitro* of the conditions prevailing in the human gastrointestinal tract. During the assay, samples of kefir were plated on selective medium for lactic acid bacteria and yeasts. After the incubation period the count of colony forming units was performed. We observed that the lactic acid bacteria of kefir are highly sensitive to the conditions prevailing in the stomach, so their survival reduced approximately five log cycles during the first 30 min of the assay. Regarding the yeasts, it appears that they are little affected by the conditions prevailing in the human gastrointestinal tract. Thus, it can be concluded that the yeast present in whole milk kefir are more resistant to the conditions prevailing in the human gastrointestinal tract than the lactic acid bacteria.

**Keywords:** whole milk kefir, survival, human gastrointestinal tract, *in vitro*, lactic acid bacteria, yeasts.

## Introdução

O kefir é um leite fermentado acidificado, que possui pequenas quantidades de álcool em sua composição. É originário das montanhas do Cáucaso, Tibet e Mongólia (LOPITZ-OTSOA et al., 2006). No Brasil, o kefir é pouco conhecido pela população sendo, portanto, pouco consumido e produzido exclusivamente de maneira artesanal (LEITE et al., 2013).

O kefir é produzido a partir dos grãos de kefir que são compostos por uma mistura específica e complexa de bactérias e leveduras que vivem em associação simbiótica (LOPITZ-OTSOA et al., 2006). Com isto, o kefir difere dos outros alimentos fermentados, pois não é o resultado da atividade metabólica de apenas um ou poucos microrganismos, mas de uma diversidade de microrganismos (LEITE et al., 2013).

Os grãos de kefir possuem forma irregular, são gelatinosos, de cor branca ou amarela, apresentam textura macia, porém firme e seu tamanho varia de 3 a 20 mm de diâmetro. Nestes grãos as bactérias e as leveduras são mantidas juntas, embebidas em uma viscosa matriz hidrossolúvel de polissacarídeos, resistente à hidrólise enzimática e composta por quantidades iguais de D-glicose e D-galactose, denominada kefiran (OTLES e CAGINDI, 2003). A composição microbiológica dos grãos de kefir e do leite fermentado produzido pelos grãos é semelhante (SIMOVA et al., 2002).

MAGALHÃES et al., (2011) identificaram 359 espécies de microrganismos no kefir de leite integral brasileiro. Destes, 60,5 % correspondiam às espécies de bactérias do ácido láctico (BAL), 30,6 % eram leveduras e 8,9 % bactérias produtoras de ácido acético. Ainda LEITE et al. (2012), ao avaliarem a microbiota dos grãos de kefir provenientes de três cidades brasileiras diferentes (Niterói - RJ; Lavras e Viçosa - MG), concluíram que o gênero *Lactobacillus* é o mais abundante, sendo a espécie *Lactobacillus kefiranofaciens* a mais comum. Com relação às leveduras a espécie *Saccharomyces cerevisiae* foi a mais abundante.

Durante o processo de fermentação é produzida uma variedade de compostos bioativos, como os ácidos orgânicos, peptídeos bioativos e exopolissacarídeos (kefiran), que atuam de forma independente ou em sinergia para proporcionar benefícios à saúde humana (LEITE et al., 2013). Dentre as atividades terapêuticas que o consumo regular do kefir proporciona, tem-se a antibacteriana (RODRIGUES et al., 2005); a antioxidante (GÜVEN e GÜLMEZ, 2003), a antitumoral (LIU et al., 2002); a restauradora da microbiota intestinal (URDANETA et al., 2007); a melhora da digestão e da tolerância à

lactose (HERTZLER e CLANCY, 2003); o efeito hipocolesterolemizante (TAYLOR e WILLIAMS, 1998); a anti-inflamatória (LEE et al., 2007) e a anti-hipertensiva (MAEDA et al., 2004).

Em função disso, o kefir pode se enquadrar na categoria de probiótico, que por definição são “microrganismos vivos que quando ingeridos em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2001). Assim, o consumo do kefir deve ser encorajado, uma vez que o mesmo é seguro para o consumo, pode ser produzido em domicílio, possui baixo custo de produção, e pode ser facilmente incorporado à dieta (ROSA et al., 2014).

Embora os critérios de seleção dos microrganismos probióticos sejam ainda controversos, dois critérios têm sido amplamente aceitos: (1) a capacidade de sobrevivência às condições do trato gastrointestinal; e (2) a capacidade de proporcionar pelo menos um benefício à saúde do hospedeiro (DIOSMA et al., 2014). Assim, o kefir preenche um dos critérios de seleção supracitados. No entanto, pouco se sabe sobre a sobrevivência dos microrganismos que compõem sua microbiota após a passagem pelo trato gastrointestinal.

Dessa forma, este estudo teve como principal objetivo avaliar a sobrevivência das BAL e das leveduras presentes no kefir de leite integral, após estas serem submetidos à simulação *in vitro* das condições prevalentes no trato gastrointestinal humano.

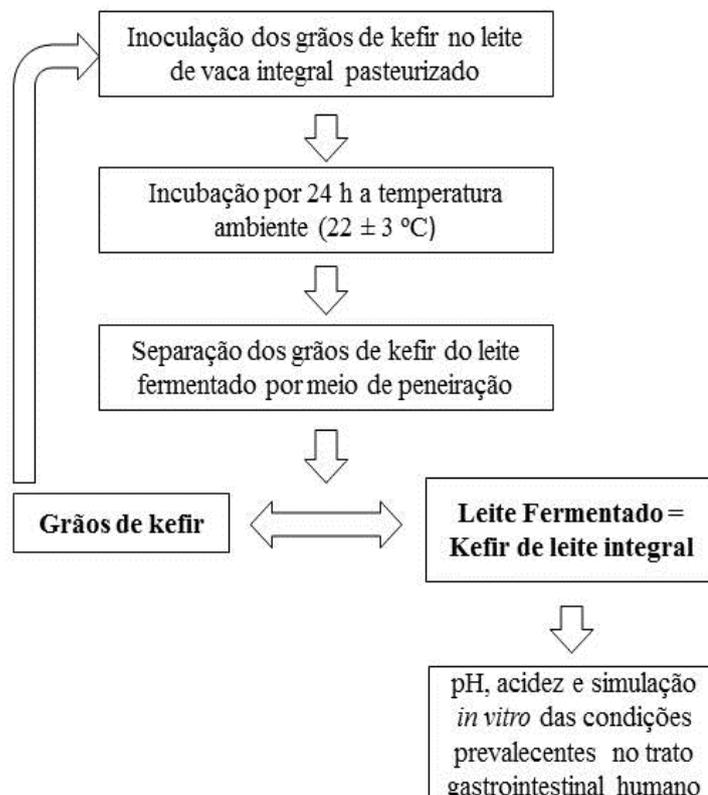
## **Material e Métodos**

### ***Preparo do Leite Fermentado: Kefir de Leite Integral***

Os grãos de kefir foram obtidos de famílias que tradicionalmente fazem o seu consumo, na região da zona da Mata Mineira, Minas Gerais, Brasil. O preparo do leite fermentado foi realizado no Laboratório de Bioquímica Nutricional, Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, Campus Viçosa-MG, onde as condições de preparo realizadas em domicílio foram reproduzidas.

Para o preparo do leite fermentado foram inoculados 8 g dos grãos de kefir em 100 mL de leite de vaca integral pasteurizado (FUNARBE, Viçosa-MG, Brasil). Este foi mantido em temperatura ambiente ( $22 \pm 3$  °C) por 24 horas, sem agitação, em recipiente de vidro fechado com tampa, porém não hermeticamente. Decorridas as 24 h

de fermentação, os grãos foram separados do leite fermentado através de peneiração, e o leite fermentado obtido foi então utilizado para a realização das análises. Doravante, o leite fermentado será chamado de kefir (Figura 1).



**Figura 1-** Preparo do kefir de leite integral

### ***Determinação do pH e da Acidez do Kefir***

O pH do kefir foi determinado com o auxílio de um pHmêtro (Instrutherm, modelo PH-1900, Brasil) previamente calibrado, em temperatura ambiente (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

A acidez foi determinada de acordo com o método de acidez titulável, utilizando como solução titulante o hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N (Vetec<sup>®</sup>, Brasil) e como indicador solução alcoólica de fenolftaleína a 1 %. A titulação foi realizada sob agitação contínua, até o ponto de viragem (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). O resultado final foi expresso em porcentagem de ácido láctico/mL de kefir.

### ***Simulação in vitro das Condições Gástricas Prevalentes no Trato Gastrointestinal Humano***

Durante 90 min os microrganismos do kefir de leite integral e do leite de vaca integral pasteurizado (FUNARBE, Viçosa-MG, Brasil) foram submetidos às condições gástricas simuladas *in vitro*, segundo metodologia de CONCEIÇÃO et al., (2013).

O meio para a simulação das condições gástricas (“suco gástrico”) continha 3% de pepsina (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA), 4% de mucina (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA) e 0,5% de cloreto de sódio (NaCl), com pH final ajustado para 2 com solução de ácido clorídrico 5 M. Assim, durante o teste de viabilidade 200 µL do kefir ou do leite integral foram tratados com 200 µL do “suco gástrico” (teste). Para o controle, 200 µL do kefir ou do leite integral foram tratados com 200 µL de solução tampão fosfato de sódio (PBS).

A cada 30 min, os microrganismos foram coletados por centrifugação a 7000 g a 4°C, por 5 min (Hermle<sup>®</sup>, modelo Z216MK, Alemanha). O sedimento formado com a centrifugação foi lavado com PBS pH 7,4 por duas vezes. Em seguida este foi recuperado em 400 µL de PBS, para o posterior plaqueamento em meio seletivo para a contagem de BAL (MRS ágar, Acumedia<sup>®</sup>, EUA) e leveduras (BDA ágar, Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA).

As placas contendo as BAL foram incubadas em estufa incubadora a 37 °C por 24 horas (BOD, modelo Tecnal - TE 390, Brasil). Após este período procedeu-se a contagem das unidades formadoras de colônia (ufc). As leveduras foram incubadas a 28 °C em estufa incubadora (BOD, modelo Tecnal - TE 390, Brasil), durante quatro dias, para que a contagem das ufc pudesse ser realizada. Os resultados encontrados foram expressos em log ufc/mL de kefir ou leite.

### ***Simulação in vitro das Condições Intestinais Prevalentes no Trato Gastrointestinal Humano***

Após os microrganismos do kefir e do leite integral serem expostos às condições gástricas simuladas *in vitro*, estes foram submetidos *in tandem* durante, 150 min, às condições intestinais simuladas *in vitro*.

O meio para a simulação das condições intestinais (“suco pancreático”) continha 1 % de pancreatina (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA), 4 % de mucina (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA), 0,3 % de sais biliares (Himedia<sup>®</sup>, EUA) e 0,5 % de NaCl, com pH final ajustado para 6,8 com solução de NaOH 1,5 M (CONCEIÇÃO et al., 2013).

Assim, 200  $\mu\text{L}$  do kefir ou do leite integral foram tratados com 200  $\mu\text{L}$  do “suco pancreático” (teste). Para o controle, 200  $\mu\text{L}$  do kefir ou do leite integral foram tratados com 200  $\mu\text{L}$  de PBS.

A cada 30 min, os microrganismos foram coletados por centrifugação a 7000 g a 4°C, por 5 min (Hermle<sup>®</sup>, modelo Z216MK, Alemanha). O sedimento formado com a centrifugação foi lavado com PBS pH 7,4 por duas vezes. Em seguida este foi recuperado em 400  $\mu\text{L}$  de PBS. Essa suspensão foi plaqueada em meio seletivo para a contagem de BAL (MRS ágar, Acumedia<sup>®</sup>, EUA) e leveduras (BDA ágar, Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA). A sobrevivência foi avaliada e registrada como descrito para as condições gástricas, e os resultados encontrados foram expressos em log ufc/mL de kefir ou leite.

## **Resultados**

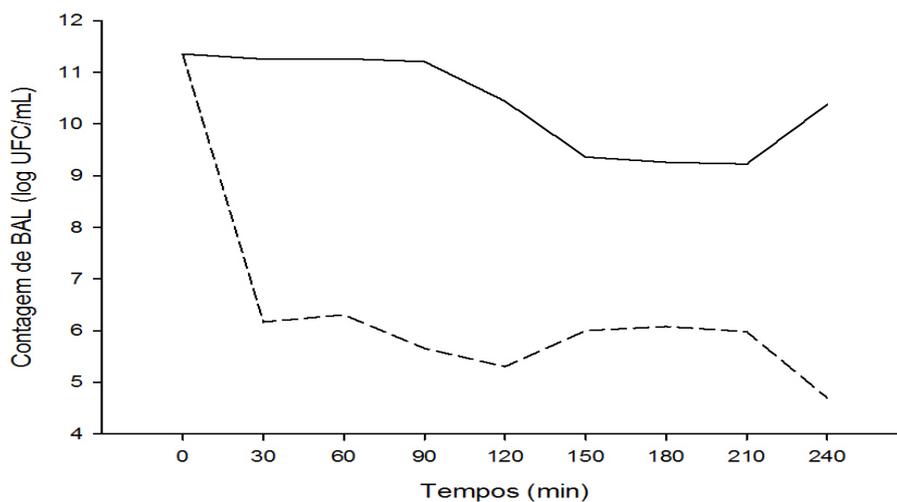
### ***pH e Acidez do Kefir***

O kefir preparado apresentou em média pH igual a  $3,86 \pm 0,1$ . Quanto à acidez, o kefir exibiu valor médio de  $0,88 \pm 0,04$  % de ácido láctico/mL de kefir.

### ***Sobrevivência das Bactérias do Ácido Láctico (BAL)***

Após quatro horas de exposição às condições prevalentes do trato gastrointestinal humano observou-se uma redução de aproximadamente 6 ciclos logarítmicos na população das BAL. Já nos primeiros 30 min de simulação constatou-se redução de aproximadamente 5 ciclos logarítmicos na população das BAL. Contudo, quando expostas às condições intestinais prevalentes observou-se uma redução de aproximadamente 1 ciclo logarítmico (Figura 2). Assim, a sobrevivência das BAL do kefir teste foi mais afetada pelas condições gástricas do que pelas condições intestinais quando comparada ao kefir controle.

Com relação ao leite integral pasteurizado, em nenhuma das diluições seriadas plaqueadas para o teste de sobrevivência de BAL, foi observado o crescimento de colônias (dados não mostrados).

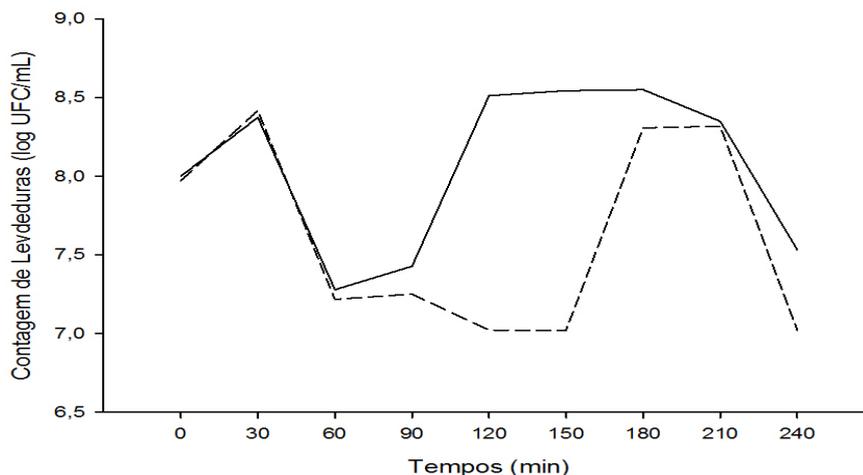


**Figura 2-** Sobrevivência das bactérias do ácido lático (BAL) presentes no kefir de leite integral após exposição às condições simuladas gástricas (0 a 90 min) e intestinais (90 a 240 min) prevalentes no trato gastrointestinal humano. Kefir teste: ----- Kefir controle: \_\_\_\_\_

### *Sobrevivência das Leveduras*

Após quatro horas de exposição às condições prevalentes do trato gastrointestinal humano observou-se uma redução de aproximadamente 1 ciclo logarítmico na contagem da população de leveduras do kefir teste. Quando expostas às condições gástricas simuladas, a sobrevivência das leveduras do kefir teste foi pouco afetada pelo ambiente ácido e pela ação da pepsina, uma vez que o comportamento foi similar entre o teste e o controle. No entanto, durante a simulação das condições intestinais, inicialmente observa-se uma queda na sobrevivência da população das leveduras. A partir do tempo 150 min a sobrevivência aumenta, mantendo-se estável até o tempo 210 min, quando a contagem reduz em aproximadamente 1 ciclo logarítmico, quando comparada ao controle (Figura 3).

Com relação ao leite integral pasteurizado, observou-se que em nenhuma das diluições decimais plaqueadas para o teste de sobrevivência de leveduras foi observado o crescimento de colônias (dados não mostrados).



**Figura 3-** Sobrevivência das leveduras presentes no kefir de leite integral após exposição às condições simuladas gástricas (0 a 90 min) e intestinais (90 a 240 min) prevalentes no trato gastrointestinal humano. Kefir teste: ----- Kefir controle: \_\_\_\_\_

## Discussão

O leite fermentado kefir é o resultado da atividade metabólica de bactérias e leveduras que convivem de maneira simbiótica e co-dependente nos grãos de kefir, dessa forma, ocorre à fermentação alcoólica e ácido-lática simultaneamente (LEITE et al., 2013).

Dentre as características organolépticas do kefir destaca-se sua acidez, a qual é decorrente da produção dos ácidos láctico e acético pela microbiota presente nos grãos de kefir (LOPITZ-OTSOA et al., 2006). O kefir preparado em nosso estudo apresentou em média pH igual a  $3,86 \pm 0,1$  e acidez de  $0,88 \pm 0,04$  % de ácido láctico/mL de kefir. Segundo as recomendações do Codex Alimentarius (CAC, 2010), o kefir deve apresentar no mínimo 0,6 % de ácido láctico/mL. Já a Instrução Normativa de nº 46 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2007) do Brasil recomenda que o kefir possua menos de 1 % de ácido láctico/mL. Neste caso, constata-se que o kefir preparado atende as exigências do Codex Alimentarius e da legislação brasileira no que diz respeito à acidez.

Com relação à composição microbiológica, a Instrução Normativa de nº 46 do MAPA (BRASIL, 2007) estabelece que o kefir deve conter no mínimo  $10^7$  ufc/mL de BAL e  $10^4$  ufc/mL de leveduras no produto pronto para consumo. Dessa forma, o kefir de leite integral preparado em nosso estudo atende as exigências da legislação brasileira,

já que o mesmo apresentou contagem aproximada de  $10^{11}$  ufc/mL de BAL e  $10^7$  ufc/mL de leveduras, no produto pronto para o consumo.

De acordo com a FAO (2001), os microrganismos probióticos devem ser capazes de resistir às condições gástricas, principalmente ao efeito do suco gástrico e devem ser capazes de proliferar na presença dos sais biliares encontrados no intestino. Dessa forma, os microrganismos probióticos serão capazes de colonizar o intestino e proporcionar efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (VERRUCK et al., 2015). A avaliação da sobrevivência dos probióticos *in vitro* é amplamente empregada, uma vez que permite simular as condições prevalentes do trato gastrointestinal de forma rápida e simples quando comparada aos métodos *in vivo*, os quais são caros, demorados e apresentam uma alta variabilidade interindividual (VERRUCK et al., 2015).

Em nosso estudo, quando expostas às condições prevalentes do trato gastrointestinal humano, a sobrevivência das BAL do kefir de leite integral reduziu expressivamente, sendo, uma redução mais acentuada observada quando estas bactérias foram expostas às condições gástricas.

As condições fisiológicas do estômago são muito prejudiciais para alguns gêneros de bactérias e a tolerância ao ambiente ácido do estômago é dependente da presença de uma matriz alimentar, da composição da membrana de cada estirpe e da atividade da enzima  $H^+$ -ATPase (VERRUCK et al., 2015). LIKOTRAFITI et al., (2015) constataram que durante a simulação das condições gástricas com o pH 2, a sobrevivência do *Lactobacillus kefir* diminuiu drasticamente já nos primeiros 15 minutos de exposição.

Com relação aos sais biliares, SANTOS et al., (2003) observaram que 85 %, das 58 estirpes de *Lactobacillus*, isoladas dos grãos de kefir de leite, eram resistentes a ação dos sais biliares presentes na simulação das condições intestinais na concentração de 0,3 %. A resistência que estas bactérias exibem seria consequência da atividade da enzima sal biliar hidrolase, a qual desconjuga os sais biliares (GUO et al., 2009). Na forma desconjugada a capacidade de emulsificar as membranas bacterianas dos sais biliares é parcialmente perdida, o que possibilita o crescimento microbiano (PAVLOVIĆ et al., 2012).

Sabe-se que o kefir de leite integral possui em sua microbiota algumas espécies de leveduras fermentadoras de lactose e não fermentadoras de lactose. Apesar da atividade metabólica das leveduras contribuírem para as características sensoriais do

kefir, estes microrganismos são pouco estudados (LEITE et al., 2013). Assim, torna-se imprescindível conhecer a sobrevivência das leveduras após a passagem pelo trato gastrointestinal.

Em nosso estudo observamos que a sobrevivência das leveduras do kefir de leite integral não sofreu grandes reduções quando expostas às condições gástricas e intestinais prevalentes. DIOSMA et al. (2014) avaliaram a sobrevivência de diferentes estirpes de quatro espécies de leveduras (*Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus*, e *Issatchenkia occidentalis*) isoladas de grãos de kefir, e constataram que todas as espécies de leveduras possuíam estirpes altamente resistentes ao ambiente ácido e à ação dos sais biliares (concentração de 0,5 ou 1 %) na simulação *in vitro*. Em estudo *in vivo* os autores observaram que todas as estirpes toleravam bem a passagem pelo trato gastrointestinal, de modo que *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 e *Saccharomyces boulardii* podiam ser encontradas no ceco dos animais na quantidade de  $10^5$  ufc/g de fezes.

A definição de probióticos enfatiza que os microrganismos devam estar vivos no momento em que são consumidos (FAO/WHO, 2001). No Brasil, a recomendação geral é de que o alimento probiótico possua no mínimo de  $10^8$  a  $10^9$  ufc/mL do microrganismo viável no produto final pronto para consumo. Caso quantidades menores estejam presentes, o fabricante deve comprovar a eficácia do produto (BRASIL, 2008). No entanto, até o presente momento não existe uma recomendação de quantidade mínima de microrganismos probióticos que deve apresentar-se viável no intestino delgado ou no cólon.

Alguns dos efeitos benéficos, proporcionados a partir do consumo regular dos probióticos, podem ser alcançados quando estes microrganismos são consumidos na forma inativa. Tais efeitos seriam consequência da interação da molécula de DNA, dos componentes da membrana e parede celular, bem como dos metabólitos produzidos por estes microrganismos durante o processo de fermentação com o hospedeiro (FARNWORTH, 2008; RIJKERS et al., 2010). Porém, OUWEHAND e SALMINEN (1998) afirmam que os efeitos benéficos à saúde, proporcionados pelo consumo de microrganismos probióticos na forma inativa, são limitados, principalmente no que diz respeito à imunestimulação.

Dessa forma, mesmo que as BAL do kefir não consigam chegar até o intestino em altas concentrações, estas ainda serão capazes de trazer benefícios a saúde humana.

Adicionalmente, as leveduras podem contribuir, já que a sobrevivência das mesmas foi pouco afetada pelas condições prevalentes no trato gastrointestinal humano.

## Conclusão

A sobrevivência das BAL presentes no kefir de leite integral declina consideravelmente quando estas são submetidas à simulação das condições prevalentes do trato gastrointestinal, principalmente no que diz respeito às condições gástricas. Quanto às leveduras, estas não parecem ser muito afetadas pelas condições prevalentes no trato gastrointestinal.

Apesar da sobrevivência dos microrganismos durante a passagem pelo trato gastrointestinal ser uma característica desejável nos microrganismos probióticos, isto não impede que os mesmos proporcionem efeitos benéficos à saúde humana. Assim, o consumo regular do kefir deve ser encorajado e estimulado na rotina da população, uma vez que o mesmo é um alimento seguro e com características de probiose.

## Referências Bibliográficas

BRASIL. ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas, 2008. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos.

BRASIL. MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa Nº 46, 2007. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados.

CAC (**Codex Alimentarius Commission**). Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex standard for fermented milks. CODEX STAN 243-2003. 2010.

CONCEIÇÃO, L. L. et al. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 in fermented milk under simulated gastric and intestinal conditions. **Beneficial Microbes**. v. 4, n. 3, p. 285-289, 2013.

DIOSMA, G. et al. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 30, p. 43–53, 2014.

FAO/WHO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization**. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, 2001.

FARNWORTH, E. R. The evidence to support health claims for probiotics. **The Journal of Nutrition**. v. 138, p. 1250–1254, 2008.

GUO, Z. et al. *In vitro* comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. **LWT - Food Science and Technology**. v. 42, p. 1640–1646, 2009.

GÜVEN, A.; GÜLMEZ, M. The Effect of Kefir on the Activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO Levels in Carbon Tetrachloride-Induced Mice Tissues. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**. v. 50, n. 8, p. 412-416, 2003.

HERTZLER, S. R.; CLANCY, S. M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal of the American Dietetic Association**. v. 103, n. 5, p. 582-587, 2003.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 25- 27.

LEE, M. et al. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model. **Immunobiology**. v. 212, p. 647-654, 2007.

LEITE, A. M. O. et al. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. **Food Microbiology**. v. 31, p. 215-221, 2012.

LEITE, A. M. O. et al. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 44, n. 2, p. 341-349, 2013.

LIKOTRAFITI, E. et al. *In vitro* evaluation of potential antimicrobial synbiotics using *Lactobacillus kefir* isolated from kefir grains. **International Dairy Journal**. v. 45, p. 23-30, 2015.

LIU, J.-R. et al. Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. **Nutrition and Cancer**. v. 44, n. 2, p. 183-187, 2002.

LOPITZ-OTSOA, F. et al. Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Revista Iberoamericana de Micologia**. v. 23, p. 67-74, 2006.

MAEDA, H. et al. Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. **BioFactors**. v. 22, p. 197-200, 2004.

MAGALHÃES, K. T. et al. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 42, p. 693-702, 2011.

- OTLES, S.; CAGINDI, O. Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**. v. 2, n. 2, p. 54-59, 2003.
- OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. J. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. **International Dairy Journal**. v. 8, p. 749 -758, 1998.
- PAVLOVIĆ, N. et al. Probiotics - Interactions with bile acids and impact on cholesterol metabolism. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 168, p. 1880–1895, 2012.
- RIJKERS, G. T. et al. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: Current status and recommendations for future research. **The Journal of Nutrition**. v. 140, p. 671–676, 2010.
- RODRIGUES, K. et al. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 25, n. 5, p. 404-8, 2005.
- ROSA, D. D. et al. Evaluation of the subchronic toxicity of kefir by oral administration in Wistar rats. **Nutrición Hospitalaria**. v. 6, p. 1352-1359, 2014.
- SANTOS, A. et al. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 26, p. 434–437, 2003.
- SIMOVA, E. et al. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 28, p. 1-6, 2002.
- TAYLOR, G. R. J.; WILLIAMS, C. M. Effects of probiotics and prebiotics on blood lipids. **British Journal of Nutrition**. v. 80, p. S225-S230, 1998.
- URDANETA, E. et al. Intestinal beneficial effects of kefir-supplemented diet in rats. **Nutrition Research**. v. 27, p. 653–658, 2007.
- VERRUCK, S. et al. The buffalo Minas Frescal cheese as a protective matrix of *Bifidobacterium* BB-12 under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**. v., p. 1-5, 2015.

## 6 ARTIGO III

### **Título: Kefir de Leite Integral Reduz a Incidência de Lesões Pré-Neoplásicas no Cólon de Ratos Wistar.**

#### **Resumo**

O consumo de probióticos tem sido associado à prevenção do desenvolvimento do câncer colorretal. Considerando que o kefir é um alimento probiótico com uma diversidade de atividades terapêuticas, este estudo teve como principal objetivo avaliar o efeito do consumo regular do kefir na redução do desenvolvimento das lesões pré-neoplásicas em ratos Wistar. Foram utilizados trinta animais que foram aleatoriamente divididos em três grupos experimentais (n = 10). Os animais receberam os tratamentos durante cinco semanas, previamente à indução das lesões pré-neoplásicas, e por mais quinze semanas após a indução, totalizando vinte semanas experimentais. Nas cinco primeiras semanas, a chamada fase de pré-indução, os animais do grupo controle foram tratados com 1 mL de água destilada, o grupo leite recebeu 1 mL de leite integral pasteurizado, e o grupo kefir foi tratado com 1 mL de kefir de leite integral, via gavagem diariamente. Na fase de pós-indução, quinze semanas subsequentes, os animais foram submetidos ao protocolo de indução de lesões pré-neoplásicas com 1,2-dimetilhidrazina, e continuaram recebendo seus respectivos tratamentos. O tratamento com o kefir foi capaz de reduzir em 36,7 % a incidência dos focos de cripta aberrante no cólon dos animais em comparação ao controle ( $p < 0,001$ ). O kefir aumentou a atividade da enzima catalase ( $p < 0,001$ ) no cólon e a concentração dos ácidos graxos de cadeia curta no conteúdo cecal ( $p = 0,046$ ). Adicionalmente, o kefir foi capaz de reduzir a razão lactulose/manitol ( $p = 0,020$ ) ao final da fase de pós-indução. Assim, conclui-se que o tratamento com o kefir de leite integral foi capaz de reduzir o desenvolvimento das lesões pré-neoplásicas, induzidas pela 1,2-dimetilhidrazina, no cólon dos animais. A atividade anticarcinogênica do kefir deveu-se ao aumento da atividade antioxidante e da produção dos ácidos graxos de cadeia curta; além da redução da permeabilidade intestinal.

**Palavras-chave:** kefir de leite integral, câncer colorretal, foco de cripta aberrante, DMH.

## Abstract

The consumption of probiotics has been associated with the prevention of colorectal cancer. Considering that kefir is a probiotic food with a variety of therapeutic activities, this study aimed to evaluate the effect of regular consumption of kefir in the reduction of the development of preneoplastic lesions in Wistar rats. Thirty animals were randomly divided into three groups (n = 10). Those animals received the treatments for five weeks prior to induction of preneoplastic lesions, and fifteen weeks after the induction, totaling twenty experimental weeks. In the first five weeks, the so-called pre-induction phase, the control group was treated with 1 mL of distilled water, the milk group received 1 mL of pasteurized milk and the kefir group was treated with 1 mL of whole milk kefir, administered daily through gavage. In the post-induction phase, after fifteen weeks, the animals were subjected to the protocol of induction of the preneoplastic lesions with 1,2-dimethylhydrazine, and continued to receive their treatments. The treatment with kefir was able to reduce by 36.7 % the incidence of aberrant crypt foci in the colon compared to the control ( $p < 0.001$ ). Kefir increased the activity of the enzyme catalase ( $p < 0.001$ ) in the colon as well as the concentration of short-chain fatty acids in the cecal content ( $p = 0.046$ ). Additionally, kefir was able to reduce the ratio lactulose/mannitol ( $p = 0.020$ ) after the end of the post-induction phase. Thus, it is concluded that the treatment with whole milk kefir was able to reduce the development of preneoplastic lesions, induced by 1,2-dimethylhydrazine, in the colon of the animals. The anticarcinogenic activity of kefir was due to the increase of the antioxidant activity and production of short chain fatty acids; besides the reduction of intestinal permeability.

**Key-words:** whole milk kefir, colorectal cancer, aberrant crypt foci, DMH.

## Introdução

O câncer colorretal (CCR) pode acometer o intestino grosso (cólon) (INCA, 2014). É a terceira causa de morte entre os diferentes tipos de câncer em todo o mundo, sendo considerado problema de saúde pública (WHO, 2014). O CCR possui causa multifatorial, mas, a maioria de seus fatores etiológicos é do tipo ambiental e podem ser prevenidos (HAGGAR e BOUSHEY, 2009). A prevenção do câncer acontece sempre que ocorre regressão, inibição ou redução de sua incidência (BIRD e GOOD, 2000).

Alguns estudos experimentais têm demonstrado que o consumo regular de alimentos/microrganismos probióticos é capaz de inibir o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas na mucosa intestinal colônica (FOO et al., 2011; CHANG et al., 2012; KUMAR et al., 2012b; MOHANIA et al., 2013; ZHU et al., 2014). Os probióticos são definidos como “microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2001).

Os mecanismos pelos quais os probióticos exercem esta atividade anticarcinogênica ainda não são totalmente conhecidos. No entanto, sabe-se que são capazes de alterar quantitativa e qualitativamente a composição da microbiota intestinal e sua atividade metabólica, além de alterar as condições físico-químicas do cólon e a fisiologia do hospedeiro. Os probióticos podem também ligar e degradar compostos carcinogênicos presentes no lúmen intestinal e produzir compostos com atividade anticarcinogênica, como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). A imunomodulação, a inibição da proliferação e a indução da apoptose das células tumorais também constituem alguns dos mecanismos descritos na literatura (UCCELLO et al., 2012; SHMUELY et al., 2013).

Um leite fermentado probiótico que vem ganhando espaço na literatura científica é o kefir. Este leite fermentado é produzido a partir da atividade metabólica de uma mistura específica e complexa de bactérias produtoras de ácido láctico e acético, além de leveduras fermentadoras de lactose e não fermentadoras de lactose, que vivem em uma associação simbiótica (LOPITZ-OTSOA et al., 2006; SARKAR, 2007).

Assim, o diferencial do kefir em comparação com outros leites fermentados está no fato de que o kefir é o resultado da atividade metabólica da associação simbiótica de uma variedade de bactérias e de leveduras (LEITE et al., 2013). Adicionalmente, o consumo regular do kefir tem sido associado a uma diversidade de atividades

terapêuticas, dentre elas a atividade antitumoral (LIU et al., 2002; RIZK et al., 2009). Contudo, não se sabe qual seria o efeito do consumo regular do kefir sobre o desenvolvimento de lesões pré-neoplasias no cólon.

Dessa forma, o principal objetivo de nosso estudo foi avaliar o efeito do consumo regular do leite fermentado, kefir, na redução do desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas no cólon de ratos Wistar. Além disso, avaliamos se a atividade anticarcinogênica do kefir envolveria as enzimas antioxidantes, a produção dos ácidos graxos de cadeia curta, alterações na permeabilidade intestinal e a produção de diferentes tipos de mucinas pelas células caliciformes.

## **Material e Métodos**

### ***Preparo do Leite Fermentado: Kefir de Leite Integral***

Os grãos de kefir foram obtidos de famílias que tradicionalmente fazem o seu consumo, na região da zona da Mata Mineira, Minas Gerais, Brasil. O preparo do kefir foi realizado no Laboratório de Bioquímica Nutricional, Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Campus Viçosa-MG, onde procurou-se reproduzir as condições de preparo realizadas em domicílio.

Para o preparo do kefir foram inoculados 8 g de grãos de kefir em 100 mL de leite de vaca integral pasteurizado. Este foi mantido em temperatura ambiente ( $22 \pm 3$  °C) por 24 horas, sem agitação, em recipiente de vidro previamente esterilizado, fechado com tampa, porém não hermeticamente.

Decorrida a fermentação, os grãos de kefir foram separados do leite fermentado através de peneiração. Em seguida, os grãos foram submetidos a um novo processo de fermentação, em leite integral pasteurizado para dar continuidade à produção. E o leite fermentado fresco foi administrado diariamente aos animais. Doravante o leite fermentado será chamado de kefir.

O kefir oferecido aos animais apresentou em média pH igual a  $3,86 \pm 0,1$ , acidez de  $0,88 \pm 0,04$  de ácido láctico/mL de kefir, contagem de bactérias do ácido láctico (BAL) de  $10^9$  ufc/mL, e de leveduras de  $10^7$  ufc/mL.

### ***Animais***

Foram utilizados trinta ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, Rodentia), com 8 semanas de vida, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura ambiente média de  $22 \pm 2$  °C. Os animais receberam água destilada e ração comercial (Presence<sup>®</sup>, Brasil) *ad libitum*.

### ***Aspectos Éticos***

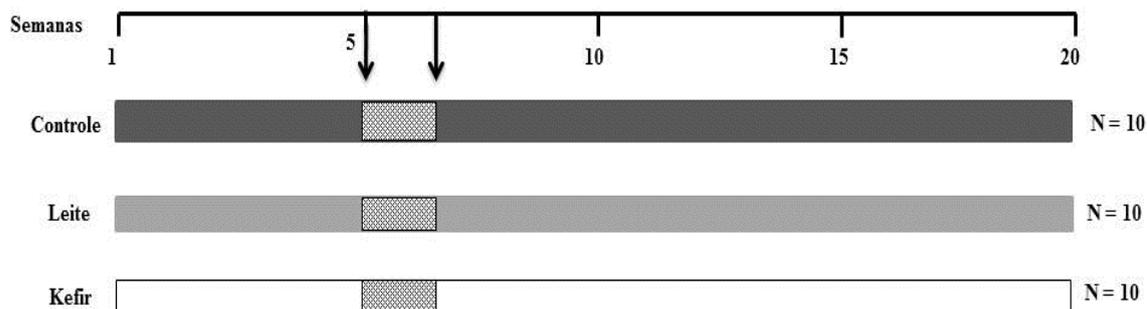
Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFV, número do protocolo: 84/2014 (Anexo A).

### ***Desenho Experimental***

Os animais foram divididos em três grupos experimentais com 10 animais cada (Figura 1). Assim, de acordo com o tratamento, temos: grupo controle, tratado com 1 mL de água destilada; grupo leite, tratado com 1 mL de leite de vaca integral pasteurizado; e grupo kefir, que foi tratado com 1 mL de kefir de leite integral.

As primeiras cinco semanas experimentais foram denominadas de fase pré-indução, durante este período os animais receberam diariamente via gavagem seus respectivos tratamentos de acordo com o grupo experimental ao qual pertenciam.

Nas quinze semanas subsequentes deu-se início a fase de pós-indução. Nesta fase todos os animais foram submetidos ao protocolo de indução de lesões pré-neoplásicas com 1,2-dimetilhidrazina (DMH) (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA), segundo LARANJEIRA et al., (1998) adaptado. Os animais receberam quatro injeções subcutâneas de DMH, na dosagem de 40 mg/kg peso corporal. Foram realizadas duas aplicações, durante duas semanas (RODRIGUES et al., 2002). Neste período, os animais continuaram recebendo os tratamentos via gavagem.



**Figura 1** - Desenho experimental. As cinco primeiras semanas correspondem à fase de pré-indução. A região hachurada, compreendida entre as setas (2 semanas), corresponde a fase de indução das lesões pré-neoplásicas com 1,2-dimetilhidrazina, quando deu-se início a fase de pós-indução, que teve duração total de quinze semanas experimentais.

O peso corporal e o consumo alimentar dos animais foram verificados semanalmente, e estes parâmetros foram utilizados para o cálculo do coeficiente de eficácia alimentar (CEA).

Após vinte semanas de experimento os animais sofreram eutanásia. Esses foram submetidos a um jejum de 12 horas, sendo posteriormente anestesiados com isoflorano a 3 % (Cristália<sup>®</sup>, Brasil) e submetidos à exsanguinação total. Assim, procedeu-se a coleta do sangue e dos demais tecidos, que foram armazenados à -80°C e em formalina de Carson para posteriores análises.

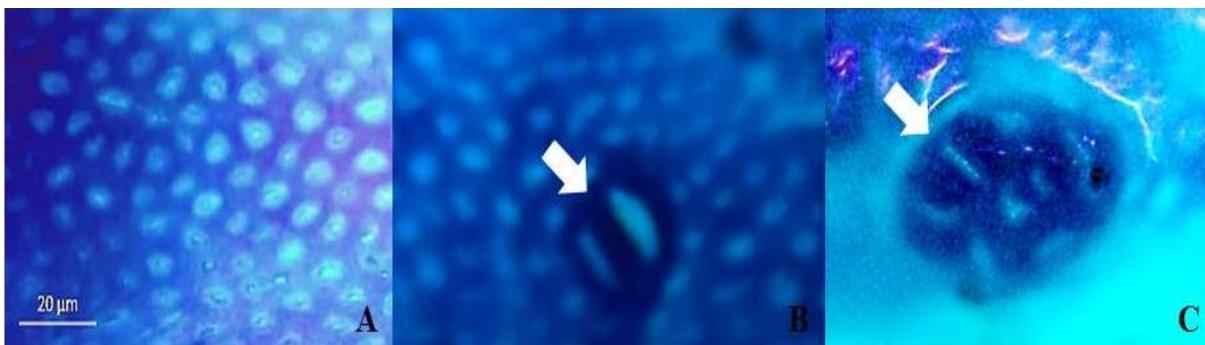
### ***Análises Bioquímicas***

O colesterol total, fração HDL-colesterol, triglicerídeos, glicose, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e creatinina foram dosados nas amostras de soro, por meio do método enzimático colorimétrico, utilizando-se kits comerciais (Bioclin<sup>®</sup>, Brasil), sendo as leituras realizadas pelo aparelho BS200. A concentração da LDL-colesterol foi calculada segundo equação de FRIEDEWALD et al., (1972).

### ***Contagem dos Focos de Criptas Aberrantes***

Após a eutanásia, o cólon foi lavado com solução tampão fostato (PBS) 50 mM, aberto longitudinalmente pela banda contra mesentérica, colocado em placas de parafina com a mucosa voltada para a parte superior da placa. Após a fixação com formalina de Carson por 24 horas, o tecido foi medido com o auxílio de uma régua e dividido em três segmentos equidistantes, que foram identificados em proximal, medial e distal em relação ao ceco.

Para a contagem dos focos de criptas aberrantes (FCA), os segmentos do cólon de cinco animais de cada grupo foram corados com solução de azul de metileno 0,1 %, por dois minutos. A contagem foi realizada com o auxílio de um microscópio de luz (Olympus America InC., modelo CBA, EUA) com aumento de 100X por dois observadores de maneira duplo-cega. A categorização dos FCA foi realizada com base no número de criptas aberrantes por foco, sendo focos com até três ou menos criptas ( $FCA \leq 3$ ) e focos com mais de três criptas ( $FCA > 3$ ) (BIRD, 1987) (Figura 2).



**Figura 2-** Focos de cripta aberrante observados na superfície da mucosa colônica de ratos Wistar, induzidos com 1,2-dimetilhidrazina, corados com azul de metileno 0,1%. A: criptas colônicas saudáveis. B: Um foco de cripta com duas criptas aberrantes ( $FCA \leq 3$ ). C: Um foco de cripta aberrante com oito criptas aberrantes ( $FCA > 3$ ).

### ***Quantificação dos Ácidos Graxos de Cadeia Curta Fecal***

Os AGCC acético, propiônico e butírico foram quantificados nas fezes frescas coletadas nas fases de pré e de pós-indução, e no conteúdo cecal, coletado após a eutanásia dos roedores.

Os AGCC foram extraídos com solução de ácido meta-fosfórico (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA) a 25 %, de acordo com metodologia proposta por SMIRICKY-TJARDES et al., (2003) adaptada.

O sobrenadante obtido após a centrifugação foi utilizado para a quantificação dos AGCC em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu<sup>®</sup>, detector modelo: SPD-10A VP acoplado ao detector ultravioleta, Japão) utilizando-se um comprimento de onda de 210 nm. Para a separação cromatográfica, 20 µL de amostra foram injetadas em uma coluna (Macherey-Nagel<sup>®</sup>, modelo EC 250/4.6 nucleosil 100-5 C18, Japão) com 250 cm x 4,6 mm de diâmetro com fluxo de 0,6 mL/minuto e pressão de 65 Kgf, e fase móvel 1% de ácido orto-fosfórico em água.

### ***Teste de Permeabilidade Intestinal***

O teste de permeabilidade intestinal foi realizado ao final das fases de pré e de pós-indução. Os animais permaneceram, em jejum, mas com livre acesso à água destilada durante todo o procedimento.

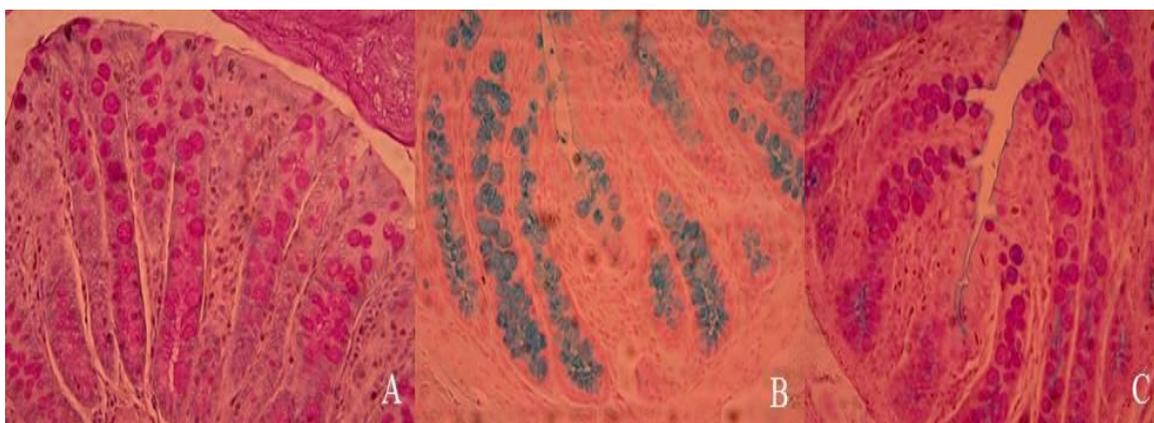
Uma solução contendo 200 mg de lactulose (Lactulona<sup>®</sup>, Áustria) e 100 mg de manitol (Synth<sup>®</sup>, Brasil) diluídos em 1 mL de água foi administrada aos animais, via gavagem. A partir deste momento toda a urina excretada nas 8 h subsequentes foi coletada (MEDDINGS et al., 1999; MENDONÇA et al., 2009).

A quantificação dos açúcares foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu<sup>®</sup>, detector modelo: RID 10A, Japão) utilizando comprimento de onda de 220 nm. Para a separação cromatográfica, 20 µL de amostra foram injetadas em uma coluna (Aminex<sup>®</sup>, modelo HPX-87H, EUA) com 300 mm x 7,8 mm de diâmetro com fluxo de 1 mL/minuto, pressão de 54 Kgf, e fase móvel de ácido sulfúrico 0,05 N/L em água.

### ***Análises Histológicas***

Fragmentos do cólon medial de cinco animais de cada grupo foram fixados em formalina de Carson. Após fixação, os tecidos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em Paraplast<sup>®</sup> (Sigma Aldrich, Suíça). Secções transversais de 5 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (Olympus America InC., modelo CUT 4055, EUA).

A fim de quantificar as células caliciformes produtoras de mucopolissacarídeo ácido, neutro e de ambos os tipos, os cortes histológicos foram submetidos às colorações de *alcian blue* e/ou ácido periódico de Schiff (Figura 3) (MCMANNUS e MOWRY, 1960).



**Figura 3-** Células caliciformes do cólon. (A) Células caliciformes produtoras de mucopolissacarídeos neutros coradas, com *alcian blue*. B: Células caliciformes produtoras de mucopolissacarídeos ácidos, coradas com ácido periódico de Schiff. C: Células caliciformes produtoras de mucopolissacarídeos ácidos e neutros, coradas com ácido periódico de Schiff e *alcian blue*.

Utilizando o aumento de 200X, foram capturadas 20 imagens de cada coloração por animal, diretamente do microscópio de luz (Zeiss<sup>®</sup>, modelo Primo Star, Alemanha) através de uma câmera fotográfica (Zeiss<sup>®</sup>, modelo Aixo ERc5s, Alemanha).

A contagem de células caliciformes e a morfometria das criptas foram realizadas utilizando-se o *software* de análise de imagem, Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetcs Inc, EUA). A profundidade das criptas foi medida em regiões onde foi possível identificar a base e o ápice da cripta que apresentavam aspecto retilíneo. Para a contagem das células caliciformes padronizou-se a sobreposição de uma matriz quadrada padrão (35 pontos x 35 pontos) nos campos fotografados, e foram contabilizadas apenas as células coincidentes com as interseções.

### ***Determinação da Concentração das Enzimas Antioxidantes no Fígado e no Cólon***

A concentração das enzimas foi determinada a partir dos homogenatos do fígado e do cólon. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Thermo Scientific<sup>®</sup>, modelo Multiskan GO, Finlândia).

A concentração da catalase (CAT) foi determinada de acordo com AEBI (1984) adaptado. Já a concentração da superóxido dismutase (SOD) foi determinada a partir de sua habilidade de reduzir à auto-oxidação do pirogallol (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, Japão) (DIETERICH et al., 2000). A concentração da glutathione-S-transferase (GST) foi determinada segundo metodologia de HABIG et al., (2002) adaptado. Método que se baseia na habilidade da GST de metabolizar o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA) conjugando com a glutathione reduzida (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA).

### ***Quantificação de TBARS no Tecido Hepático***

A mensuração dos metabólitos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada de acordo com metodologia proposta por BUEGE e AUST (1978), no homogenato do tecido hepático. Este método baseia-se na capacidade do malondialdeído, quando aquecido juntamente com o ácido tiobarbitúrico (Merck<sup>®</sup>, Alemanha), em condições ácidas, formar um produto de coloração rosa que pode ser mensurado em espectrofotômetro (Thermo Scientific<sup>®</sup>, modelo Multiskan GO, Finlândia) a um comprimento de onda de 535 nm.

### ***Determinação de Proteínas***

A quantidade de proteínas presentes no tecido hepático e no cólon utilizados nas análises de CAT, SOD, GST e TBARS foram mensuradas segundo metodologia de LOWRY et al., (1951). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Thermo Scientific<sup>®</sup>, modelo Multiskan GO, Finlândia), a um comprimento de onda de 700 nm.

### ***Análise Estatística***

A normalidade das variáveis foi determinada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As comparações entre os três grupos foi realizada pela análise de variância

(ANOVA *one way*) seguida do teste *post hoc* de Tukey para dados com distribuição normal.

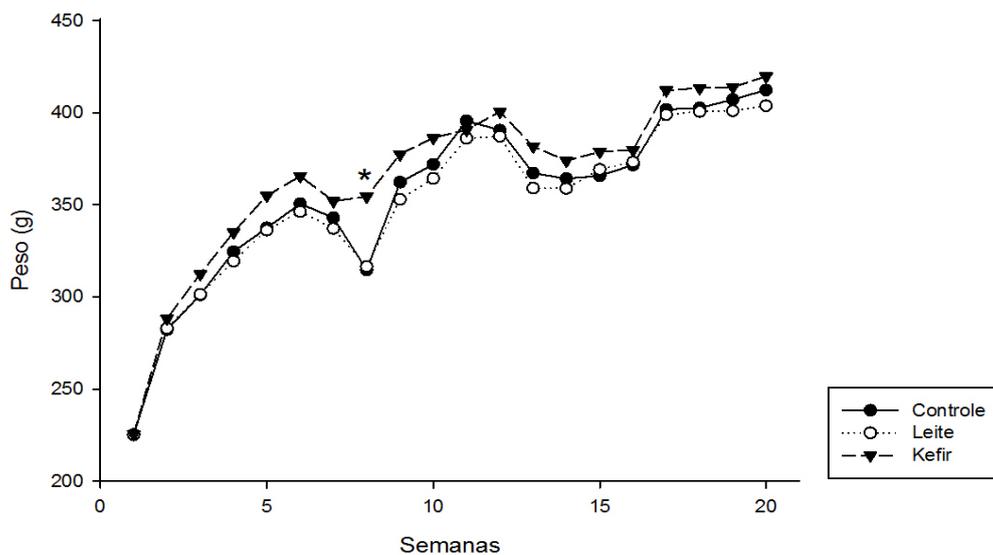
O teste *t* pareado foi utilizado para a comparação dos resultados das fases de pré e pós-indução dentro de um mesmo grupo. Já o teste de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a presença de correlação entre as variáveis de interesse. Foi considerado um  $\alpha$  igual a 5 %. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o *software* SPSS, versão 20 para *Windows* (SPSS INC. Chicago, IL. EUA). Para a construção dos gráficos utilizou-se o *software* GraphPad Prism, versão 6 para *Windows* (GraphPad Prism Inc, EUA).

## **Resultados**

### ***Parâmetros de Crescimento e Bioquímicos***

O peso corporal dos animais diferiu apenas na oitava semana experimental ( $p = 0,013$ ), onde a média de peso do grupo kefir foi maior em comparação com os grupos leite e controle (Figura 4). Quanto ao CEA, peso do fígado e índice hepatossomático não foi observado diferença estatística entre os grupos experimentais ( $p > 0,05$ ; dados não mostrados).



**Figura 4-** Peso corporal/semana dos grupos experimentais. Os valores são expressos como média (n = 10). Diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos experimentais, segundo teste de Tukey.

Com relação aos parâmetros bioquímicos, as concentrações séricas da glicose, do colesterol total, das frações HDL e LDL-colesterol, dos triglicerídeos, da AST e da ALT não diferiram entre os grupos experimentais. No entanto, a concentração de creatinina apresentou-se aumentada no grupo leite em comparação com o grupo controle (Tabela 1).

**Tabela1-** Parâmetros bioquímicos.

| <b>Parâmetros</b>         | <b>Controle</b>           | <b>Leite</b>              | <b>Kefir</b>               | <b>Valor de p</b> |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------|
| Glicose (mmol/L)          | 8,1 ± 0,96                | 8,26 ± 0,53               | 8,5 ± 0,68                 | 0,533             |
| Colesterol Total (mmol/L) | 1,93 ± 0,58               | 1,93 ± 0,49               | 1,86 ± 0,24                | 0,937             |
| HDL (mmol/L)              | 0,71 ± 0,087              | 0,65 ± 0,069              | 0,59 ± 0,091               | 0,064             |
| LDL (mmol/L)              | 0,61 ± 0,11               | 0,84 ± 0,29               | 0,89 ± 0,31                | 0,096             |
| Triglicerídeos (mmol/L)   | 0,77 ± 0,21               | 0,71 ± 0,12               | 0,76 ± 0,26                | 0,793             |
| Creatinina (µmol/L)       | 42,93 ± 2,59 <sup>a</sup> | 48,97 ± 5,56 <sup>b</sup> | 45,08 ± 2,97 <sup>ab</sup> | 0,023             |
| AST (µKat/L)              | 1,99 ± 0,36               | 1,88 ± 0,26               | 1,94 ± 0,25                | 0,738             |
| ALT (µKat/L)              | 0,84 ± 0,26               | 0,87 ± 0,19               | 0,86 ± 0,14                | 0,946             |

Os valores são expressos como média ± DP (n = 10). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p < 0,05) entre os grupos, segundo teste de Tukey.

### ***Contagem de FCA***

No segmento proximal do cólon, o grupo kefir apresentou menor contagem de FCA ≤ 3 em comparação com os demais grupos experimentais. Já no segmento medial a contagem de FCA ≤ 3 foi semelhante entre os grupos kefir e controle e, menor no grupo leite. No segmento distal a contagem de FCA ≤ 3 foi semelhante entre os grupos experimentais (Tabela 2).

Com relação à quantidade de FCA > 3, os grupos kefir e leite apresentaram contagem inferior em relação ao grupo controle no segmento proximal do cólon. No segmento medial a contagem de FCA > 3 foi menor no grupo leite em comparação com os demais. No segmento distal, o grupo leite apresentou menor contagem dos FCA > 3 quando comparado ao demais, contudo a contagem do grupo kefir foi inferior a do grupo controle (Tabela 2).

Comparando a contagem de FCA total por segmento do cólon, o grupo kefir apresentou menor contagem nos segmentos proximal em comparação com os demais, sendo que a contagem do grupo leite foi menor do que a do grupo controle. No segmento medial a contagem do grupo leite foi menor em comparação com os demais grupos. Já no segmento distal a contagem dos grupos kefir e leite foram menores do que a do grupo controle (Tabela 2).

Assim, considerando a contagem de FCA total do cólon, os grupos leite e kefir apresentaram uma redução do número de FCA de 27 e 36 % em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ), respectivamente.

**Tabela 2-** Efeito do tratamento com kefir sobre o número de FCA /segmento do cólon dos animais.

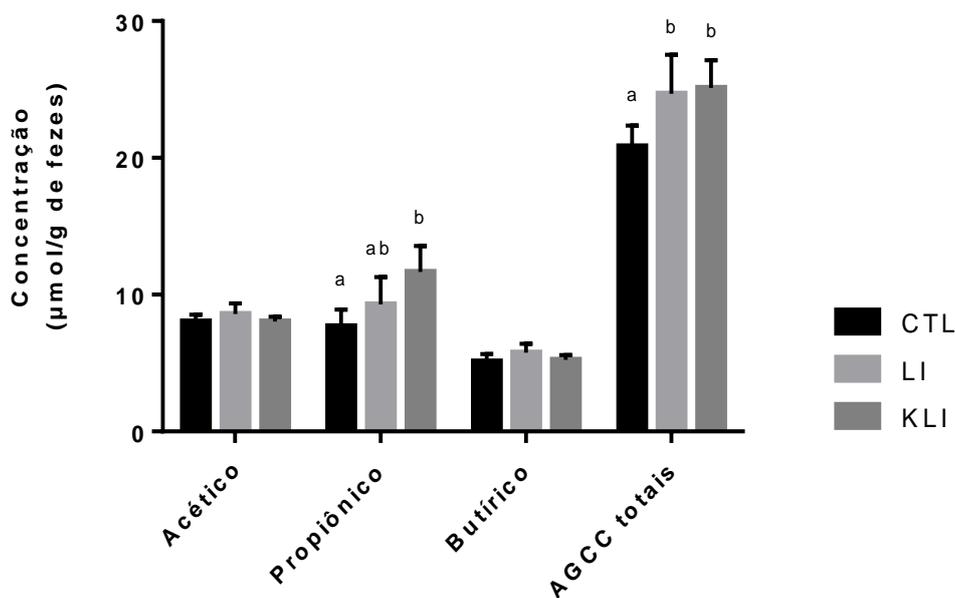
| FCA/ Segmento do Cólon    | Controle                      | Leite                         | Kefir                          | Valor de p |
|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------|
| <i>Proximal</i>           |                               |                               |                                |            |
| FCA $\leq$ 3              | 50,2 $\pm$ 9,33 <sup>a</sup>  | 44,0 $\pm$ 8,3 <sup>a</sup>   | 32,4 $\pm$ 1,81 <sup>b</sup>   | 0,007      |
| FCA $>$ 3                 | 15 $\pm$ 1,87 <sup>a</sup>    | 4,2 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>    | 3,4 $\pm$ 2,3 <sup>b</sup>     | $<$ 0,001  |
| FCA Total                 | 65,2 $\pm$ 8,04 <sup>a</sup>  | 48,2 $\pm$ 8,43 <sup>b</sup>  | 35,8 $\pm$ 3,86 <sup>c</sup>   | $<$ 0,001  |
| <i>Medial</i>             |                               |                               |                                |            |
| FCA $\leq$ 3              | 118,2 $\pm$ 6,87 <sup>a</sup> | 54,6 $\pm$ 3,91 <sup>b</sup>  | 118,6 $\pm$ 13,99 <sup>a</sup> | $<$ 0,001  |
| FCA $>$ 3                 | 78,2 $\pm$ 4,97 <sup>a</sup>  | 26,2 $\pm$ 5,76 <sup>b</sup>  | 79,8 $\pm$ 11,6 <sup>a</sup>   | $<$ 0,001  |
| FCA Total                 | 196,4 $\pm$ 10 <sup>a</sup>   | 80,8 $\pm$ 4,86 <sup>b</sup>  | 198,4 $\pm$ 23,45 <sup>a</sup> | $<$ 0,001  |
| <i>Distal</i>             |                               |                               |                                |            |
| FCA $\leq$ 3              | 65,0 $\pm$ 8,39               | 55,6 $\pm$ 9,29               | 53,8 $\pm$ 10,54               | 0,175      |
| FCA $>$ 3                 | 31,0 $\pm$ 2 <sup>a</sup>     | 11,2 $\pm$ 1,3 <sup>c</sup>   | 17,6 $\pm$ 1,51 <sup>b</sup>   | $<$ 0,001  |
| FCA Total                 | 96,0 $\pm$ 9,82 <sup>a</sup>  | 66,8 $\pm$ 8,46 <sup>b</sup>  | 71,4 $\pm$ 9,6 <sup>b</sup>    | 0,001      |
| <i>FCA Total do Cólon</i> | 226,4 $\pm$ 20 <sup>a</sup>   | 163,2 $\pm$ 13,1 <sup>b</sup> | 143,0 $\pm$ 7,14 <sup>b</sup>  | $<$ 0,001  |

Os valores são expressos como média  $\pm$  DP (n = 5). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos, segundo teste de Tukey.

### **Ácidos Graxos de Cadeia Curta**

A concentração dos AGCC analisados nas fezes coletadas ao final das fases de pré e pós-indução foi semelhante entre os grupos experimentais. Além disso, quando comparadas às concentrações dos AGCC em um mesmo grupo nas diferentes fases de coleta, não se observou diferença ( $p > 0,05$ ; dados não mostrados).

Nas fezes do conteúdo cecal, observou-se que a concentração do ácido propiônico ( $p = 0,011$ ) foi maior no grupo kefir em comparação com os demais grupos experimentais. Já a concentração total dos AGCC ( $p = 0,046$ ) foi maior nos grupos leite e kefir em comparação com o controle (Figura 5).



**Figura 5-** Perfil de AGCC (acético, propiônico e butírico) do conteúdo cecal dos animais. Os valores são expressos como média  $\pm$  DP (n = 10). Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos, segundo teste de Tukey. CTL: controle, LI: leite integral, KLI: kefir leite integral.

### *Teste de Permeabilidade Intestinal*

Ao final da fase de pré-indução a porcentagem de excreção dos açúcares lactulose e manitol, e a razão de excreção dos mesmos não diferiu entre os grupos experimentais. No entanto, ao final da fase de pós-indução, a porcentagem de excreção de manitol foi maior no grupo kefir em comparação com o controle. Ainda, a razão de excreção de lactulose/manitol foi menor no grupo kefir em comparação ao grupo controle (Tabela 3).

Contudo, quando comparadas a porcentagem de excreção dos açúcares e a razão lactulose/manitol das fases de pré e pós-indução dentro do mesmo grupo experimental não se observou diferença ( $p > 0,05$ ; dados não mostrados).

**Tabela 3-** Teste de permeabilidade intestinal realizado nas fases de pré e pós-indução.

| <b>Porcentagem de Excreção</b> | <b>Controle</b>          | <b>Leite</b>               | <b>Kefir</b>             | <b>Valor de p</b> |
|--------------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------|
| <i>Pré-indução</i>             |                          |                            |                          |                   |
| Lactulose (%)                  | 1,15 ± 0,22              | 0,76 ± 0,05                | 0,79 ± 0,09              | 0,213             |
| Manitol (%)                    | 0,21 ± 0,02              | 0,18 ± 0,02                | 0,25 ± 0,03              | 0,290             |
| Razão Lactulose/Manitol (%)    | 5,03 ± 0,5               | 4,25 ± 0,31                | 3,92 ± 0,46              | 0,206             |
| <i>Pós-indução</i>             |                          |                            |                          |                   |
| Lactulose (%)                  | 1,05 ± 0,16              | 0,98 ± 0,12                | 0,72 ± 0,03              | 0,189             |
| Manitol (%)                    | 0,21 ± 0,01 <sup>a</sup> | 0,23 ± 0,005 <sup>ab</sup> | 0,26 ± 0,01 <sup>b</sup> | 0,009             |
| Razão Lactulose/Manitol (%)    | 5,04 ± 0,71 <sup>a</sup> | 4,21 ± 0,50 <sup>ab</sup>  | 2,72 ± 0,05 <sup>b</sup> | 0,020             |

Os valores são expressos como média ± DP (n = 8). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p < 0,05) entre os grupos, segundo teste de Tukey.

Adicionalmente, por meio do teste de correlação de Pearson observamos uma correlação positiva forte (p = 0,047; cc = 0,884) entre a razão lactulose/manitol da fase de pós-indução com a contagem dos FCA totais no cólon dos animais tratados com o kefir.

### ***Avaliação Histológica***

A porcentagem de células calciformes produtoras de mucopolissacarídeos ácidos, neutros e de ambos os tipos não diferiram entre os grupos experimentais. A profundidade das criptas colônicas também não foi afetada por nenhum dos tratamentos (p > 0,05; dados não mostrados).

### ***Concentração da CAT, SOD e GST no Cólon e no Fígado***

No cólon dos animais a concentração da CAT foi maior nos grupos leite e kefir em comparação com o controle. A concentração da SOD foi semelhante entre os grupos experimentais. Contudo, a concentração da GST no cólon foi estatisticamente maior no grupo leite em comparação com os demais grupos (Tabela 4).

No tecido hepático, a concentração da CAT foi estatisticamente menor no grupo leite em comparação com os demais. As concentrações da SOD e da GST não diferiram entre os grupos experimentais no tecido hepático dos animais (Tabela 4).

Com relação à concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado dos animais, não foi observada diferença estatística ( $p > 0,05$ ; dados não mostrados) entre os grupos experimentais.

**Tabela 4-** Concentração das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GST no cólon e no fígado dos animais.

| <b>Enzimas Antioxidantes</b>         | <b>Controle</b>          | <b>Leite</b>              | <b>Kefir</b>               | <b>Valor de p</b> |
|--------------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------|
| <i>CAT (U/mg de proteína)</i>        |                          |                           |                            |                   |
| Cólon                                | 2,86 ± 0,7 <sup>a</sup>  | 9,02 ± 2,42 <sup>b</sup>  | 7,04 ± 1,57 <sup>b</sup>   | < 0,001           |
| Fígado                               | 15,98 ± 5,9 <sup>a</sup> | 8,46 ± 3,2 <sup>b</sup>   | 13,54 ± 4,87 <sup>ab</sup> | 0,026             |
| <i>SOD (U/mg de proteína)</i>        |                          |                           |                            |                   |
| Cólon                                | 27,42 ± 3,43             | 29,31 ± 7,95              | 23,33 ± 5,52               | 0,391             |
| Fígado                               | 19,26 ± 4,75             | 22,18 ± 4,37              | 18,89 ± 3,8                | 0,209             |
| <i>GST (nmol/min/mg de proteína)</i> |                          |                           |                            |                   |
| Cólon                                | 9,96 ± 3,1 <sup>a</sup>  | 24,52 ± 6,57 <sup>b</sup> | 15,04 ± 3,23 <sup>a</sup>  | 0,003             |
| Fígado                               | 44,73 ± 7,05             | 44,95 ± 4,99              | 40,23 ± 6,32               | 0,234             |

Os valores são expressos como média ± DP (n = 5-10). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos, segundo teste de Tukey.

## Discussão

O CCR é a terceira causa de morte entre os diferentes tipos de câncer em todo o mundo (WHO, 2014). Seus fatores etiológicos são múltiplos e, recentemente, a composição da microbiota intestinal tem sido apontada como mais um fator de risco para o desenvolvimento desse tipo de câncer (WU et al., 2013). Com isto, acredita-se que o consumo de alimentos capazes de modular positivamente a composição desta microbiota, como os probióticos, poderiam contribuir para a diminuição do risco de desenvolvimento do CCR (SERBAN, 2014). Dessa forma, avaliamos o efeito do consumo regular do kefir na redução do desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas, induzidas com DMH, em ratos Wistar.

O tratamento com o kefir foi capaz de impedir a perda de peso que usualmente ocorre após a indução das lesões pré-neoplásicas devido ao aumento do estresse

metabólico. Este efeito é positivo, uma vez que a demanda energética do organismo aumentará na tentativa de combater o desenvolvimento das lesões, induzidas pela DMH.

Os tratamentos foram bem tolerados pelos animais, não sendo identificado nenhum efeito adverso. Contudo, o grupo leite apresentou um aumento na concentração sérica de creatinina em comparação com o controle. Esse aumento poderia ser consequência do aumento do metabolismo muscular neste grupo.

As lesões pré-neoplásicas no cólon, induzidas pela DMH em modelos animais, são semelhantes às lesões humanas, sendo, portanto, consideradas modelos de alta reprodutibilidade para o estudo do CCR (NEWELL e HEDDLE, 2004). Estas pré-lesões correspondem às criptas aberrantes, que formam os focos de criptas aberrantes (FCA) quando mais de uma cripta aberrante está presente. A contagem dos FCA é um marcador importante, pois quanto maior a quantidade de FCA presentes maior a chance de desenvolvimento tumoral (BIRD e GOOD, 2000).

Em nosso estudo os animais tratados com o kefir durante as 20 semanas experimentais apresentaram uma redução de 36,7 % na incidência dos FCA no cólon quando comparado ao grupo controle. Logo, podemos inferir que o tratamento com o kefir de leite integral foi capaz de reduzir o desenvolvimento das lesões pré-neoplásicas induzidas com a DMH. Acredita-se que os efeitos benéficos dos probióticos no combate ao desenvolvimento do CCR ocorrem apenas nas fases iniciais do desenvolvimento da doença. Nas fases mais avançadas, o tratamento com os probióticos teria efeito limitado (LEBLANC e PERDIGÓN, 2004; CAPURSO et al., 2006). Os mecanismos pelos quais os probióticos exercem esta atividade anticarcinogênica são múltiplos (SERBAN, 2014). Assim, tentamos identificar por meio de qual mecanismo o tratamento com o kefir foi capaz de diminuir a contagem dos FCA no cólon dos animais.

Um dos mecanismos propostos pelo qual os probióticos exercem a atividade anticarcinogênica é dependente da produção de determinados compostos como os AGCC (KAHOULI et al., 2013). Em nosso estudo, a concentração total dos AGCC e do ácido propiônico no conteúdo fecal do grupo kefir foram maiores em comparação com o grupo controle. No entanto, a concentração dos AGCC presentes nas fezes das gaiolas coletadas nos períodos de pré e pós-indução foram estatisticamente semelhantes entre os grupos. Quanto a isto, sabe-se que a concentração dos AGCC diminui progressivamente até alcançar o cólon descendente, uma vez que ao longo do percurso estes são absorvidos e utilizados pelos colonócitos (KUMAR et al., 2012a).

Dentre os AGCC, o ácido butírico é o mais estudado quando se trata de CCR, uma vez que este auxilia na regulação do balanço entre proliferação, diferenciação e apoptose dos colonócitos (SERBAN, 2014). No entanto, as BAL não são capazes de produzir o ácido butírico (HIJOVA e CHMELAROVA, 2007). Considerando que, o kefir utilizado neste estudo possui uma quantidade expressiva de BAL ( $10^9$  ufc/ml), isto justifica a ausência de diferença estatística entre os grupos experimentais quanto à concentração do ácido butírico nas fezes.

Porém, de acordo com TEDELIND et al., (2007) o ácido propiônico é equipotente ao ácido butírico no que diz respeito a atividade anti-inflamatória. O ácido propiônico é capaz de suprimir a ativação do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B, além de regular a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias. Este ácido também é capaz de estimular a apoptose das células tumorais e exibe atividade antiproliferativa. Além disso, depois do ácido butírico, o ácido propiônico é o segundo AGCC preferencialmente utilizado pelos colonócitos como substrato energético (HOSSEINI et al., 2011).

O aumento da concentração total dos AGCC também é um resultado importante, uma vez que estes atuam de forma sinérgica. Como exemplo temos que a absorção do ácido butírico é aumentada na presença dos ácidos acético e propiônico (KILNER et al., 2012). Dessa forma, a atividade anticarcinogênica que cada AGCC exerce de forma isolada é potencializada e pode contribuir para a redução da incidência dos FCA no cólon.

Outro efeito importante do tratamento com o kefir foi à redução da razão lactulose/manitol ao final da fase de pós-indução. Esta razão é usada como marcador da permeabilidade intestinal, que é definida como a propriedade que as células epiteliais do intestino possuem de permitir a passagem de moléculas por meio da difusão não mediada, independente do gradiente de concentração ou de pressão (TEIXEIRA et al., 2014).

O monossacarídeo manitol é absorvido através da via transcelular, por meio de pequenos poros aquosos, de alta incidência, presentes na membrana das células epiteliais intestinais. Já o dissacarídeo lactulose, é absorvido por meio da via paracelular, ou seja, entre as células epiteliais. Com isto, o aumento da absorção de lactulose é indicativo de aumento da permeabilidade intestinal, enquanto o aumento da absorção de manitol indica aumento da área de superfície intestinal (ARRIETA et al.,

2006). Assim, uma razão lactulose/manitol elevada indica a presença de permeabilidade intestinal aumentada, ou seja, disfunção de barreira intestinal.

A disfunção da barreira intestinal pode aumentar a passagem de antígenos pela mucosa intestinal, o que pode dar início a um processo inflamatório crônico, o qual está diretamente relacionado ao desenvolvimento do CCR (SCHWABE e JOBIN, 2013). Em função disto, em nosso estudo observamos uma correlação positiva forte entre a razão de excreção de lactulose/manitol da fase de pós-indução com a contagem dos FCA totais no cólon dos animais tratados com o kefir. Assim, a redução da permeabilidade intestinal constitui outro mecanismo utilizado pelo kefir para exercer a atividade anticarcinogênica.

O consumo regular dos probióticos está relacionado à melhora da função da barreira intestinal, como o aumento da produção de muco pelas células caliciformes (KAHOULI et al., 2013). Este aumento seria consequência de um estímulo para a expressão dos genes MUC, principalmente MUC 2. Com isto, a produção de muco aumentaria sem que o número de células caliciformes fosse alterado (CARASI et al., 2014). Este pode ter sido o caso de nosso estudo, onde o tratamento com o kefir não alterou o número de células caliciformes produtoras de mucinas ácidas, neutras e de ambos os tipos no cólon dos animais. Adicionalmente, a morfometria das criptas colônicas também não foi alterada.

Estudos experimentais têm demonstrado que a atividade anticarcinogênica dos probióticos se deve, em parte, a atividade antioxidante dos mesmos (KUMAR et al., 2012b; MOHANIA et al., 2013). O tecido colônico se encontra constantemente exposto à ação dos radicais livres, uma vez que estes são produzidos naturalmente durante o processo inflamatório e respiração celular, além de serem produzidos por alguns microrganismos presentes em nossa microbiota intestinal (ZHU et al., 2013; IRRAZÁBAL et al., 2014). Adicionalmente, em modelos experimentais induzidos ao câncer de cólon com DMH, a exposição do cólon aos radicais livres é ainda maior, já que a DMH eleva a produção destes compostos nesta região (SENGOTTUVELAN et al., 2006).

Assim, um sistema antioxidante eficiente é indispensável para o combate ao desenvolvimento das lesões pré-neoplásicas. Dessa forma, em nosso estudo a atividade da enzima antioxidante CAT aumentou no cólon dos animais tratados com o kefir em comparação com o controle.

KUMAR et al., (2012b) observaram que os animais suplementados com *Lactobacillus plantarum* AS1 ( $10^9$  ufc/mL) durante 26 semanas, sendo 5 semanas antes da indução das lesões pré-neoplásicas com DMH e 21 semanas após a indução, apresentaram aumento da atividade das enzimas CAT, SOD e GST no tecido colônico em comparação com o controle. Em outro estudo, o leite fermentado Dahi adicionado de *Lactobacillus acidophilus* LaVK2 e *Lactobacillus plantarum* Lp9 ( $2 \times 10^9$  ufc/g de cada estirpe) foi capaz de aumentar a atividade da enzima GST no fígado e no cólon dos animais tratados (MOHANIA et al., 2013). Em ambos os estudos supracitados a contagem de FCA foi menor nos grupos tratados com os probióticos em comparação com os grupos não tratados, indicando um efeito protetor dos probióticos (KUMAR et al., 2012b; MOHANIA et al., 2013).

Essas diferenças na atividade das enzimas do sistema antioxidante podem ser consequência de uma adaptação decorrente do estresse oxidativo aumentado ou diminuído naquele órgão. Além disso, podem ter sido usadas outras vias antioxidantes diferentes da enzimática para eliminar os radicais livres (CASTEX et al., 2010).

Os animais tratados com o leite integral também apresentaram uma redução significativa no número de FCA, embora esta redução seja em menor proporção frente ao tratamento com o kefir. Alguns componentes do leite como o cálcio, caseína, vitamina D, lactose são conhecidos por sua atividade anticarcinogênica. Estes nutrientes são capazes de se ligar aos compostos carcinogênicos presentes no lúmen intestinal, impedindo que estes interajam com os colonócitos. Ainda, influenciam os processos de diferenciação, apoptose, e proliferação celular, além de, exibirem atividade antioxidante e imunomodulatória (DAVOODI et al., 2013).

Assim, as diferenças observadas entre os tratamentos com o leite e o kefir devem-se a ação da microbiota do kefir e de seus metabólitos sobre os colonócitos. A disbiose da microbiota intestinal afeta de maneira prejudicial à saúde do hospedeiro e tem sido associada ao desenvolvimento de algumas doenças crônicas não transmissíveis, como o câncer (WU et al., 2013). MAGALHÃES et al., (2011) identificaram 359 espécies de microrganismos no kefir de leite brasileiro. Adicionalmente, durante o processo de fermentação é produzido uma variedade de compostos que podem auxiliar no combate ao desenvolvimento do CCR, como os AGCC e os peptídeos bioativos (DAVOODI et al., 2013). Dessa forma, acredita-se que os efeitos benéficos à saúde proporcionados pelo consumo regular do leite são potencializados quando o mesmo é fermentado pelos grãos de kefir.

## Conclusão

O kefir de leite integral foi capaz de reduzir o desenvolvimento dos FCA, induzidos pela DMH, no cólon dos animais. Os mecanismos utilizados pelo kefir incluíram o aumento da produção dos AGCC totais, principalmente propionato, a redução da permeabilidade intestinal e o aumento da concentração das enzimas do sistema antioxidante.

O tratamento com o leite integral pasteurizado também foi capaz de reduzir o desenvolvimento dos FCA, além de aumentar a produção dos AGCC totais e a concentração das enzimas do sistema antioxidante.

Contudo, o consumo do kefir de leite deve ser encorajado, já que este além de fornecer os mesmos nutrientes que o leite, possui uma microbiota diversa que quando consumida regularmente proporciona benefícios à saúde humana. Adicionalmente, esta microbiota produz compostos bioativos, como peptídeos e AGCC, os quais têm sido associados com a melhora do estado de saúde, e consequente, redução na incidência das doenças crônicas não transmissíveis.

## Referências

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods of Enzimology**. v. 105, p. 121-127, 1984.
- ARRIETA, M. C. et al. Alterations in intestinal permeability. **Gut**. v. 55, p. 1512–1515, 2006.
- BIRD, R. P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings **Cancer Letters**. v. 37, p. 147-151, 1987.
- BIRD, R. P.; GOOD, C. K. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Toxicology Letters**. v., p. 395 – 402, 2000.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. *In Methods Enzymol*. New York: Academic Press, 1978. Cap. Microsomal lipid peroxidation. p. 302-310.
- CAPURSO, G. et al. Probiotics and the incidence of colorectal cancer: when evidence is not evident. **Digestive and Liver Disease**. v. 38, n. 2, p. 277–282, 2006.
- CARASI, P. et al. Impact of kefir derived *Lactobacillus kefiri* on the mucosal immune response and gut microbiota. **Journal of Immunology Research**. v., 2014.
- CASTEX, M. et al. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 28, p. 622-631, 2010.

CHANG, J. H. et al. Effect of *Lactobacillus acidophilus* KFRI342 on the development of chemically induced precancerous growths in the rat colon. **Journal of Medical Microbiology**. v. 61, p. 361–368, 2012.

DAVOODI, H. et al. Effects of milk and milk products consumption on cancer: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 12, 2013.

DIETERICH, S. et al. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: Increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**. v. 101, p. 33-39, 2000.

FAO/WHO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization**. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, 2001.

FOO, N.-P. et al. Probiotics prevent the development of 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colonic tumorigenesis through suppressed colonic mucosa cellular proliferation and increased stimulation of macrophages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 59, p. 13337–13345, 2011.

FRIEDWALD, R. et al. Estimation of concentration of low density lipoproteins separated by three different methods. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. v. 18, p. 499-502, 1972.

HAGGAR, F. A.; BOUSHEY, R. P. Colorectal cancer epidemiology: Incidence, mortality, survival, and risk factors. **Clinics In Colon And Rectal Surgery**. v. 22, n. 4, 2009.

HIJOVA, E.; CHMELAROVA, A. Short chain fatty acids and colonic health. **Bratisl Lek Listy**. v. 108, n. 8, p. 354-358, 2007.

HOSSEINI, E. et al. Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. **Nutrition Reviews**. v. 69, n. 5, p. 245–258, 2011.

INCA. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. 2014. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal/definicao+>. Acessado em: 22 de junho de 2015.

IRRAZÁBAL, T. et al. The multifaceted role of the intestinal microbiota in colon cancer. **Molecular Cell**. v. 54, p. 309-320, 2014.

KAHOULI, I. et al. Probiotics in colorectal cancer (CRC) with emphasis on mechanisms of action and current perspectives. **Journal of Medical Microbiology**. v. 62, p. 1107–1123, 2013.

KILNER, J. et al. A proteomic analysis of differential cellular responses to the short-chain fatty acids butyrate, valerate and propionate in colon epithelial cancer cells. **Molecular Biosystems**. v. 8, p. 1146–1156, 2012.

KUMAR, M. et al. Probiotic metabolites as epigenetic targets in the prevention of colon cancer. **Nutrition Reviews**. v. 71, n. 1, p. 23–34, 2012a.

KUMAR, R. S. et al. *Lactobacillus plantarum* AS1 isolated from south indian fermented food *Kallappam* suppress 1,2-dimethylhydrazine (dmh)-induced colorectal cancer in male wistar rats. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 166, p. 620–631, 2012b.

LARANGEIRA, L. L. S. et al. Localização de lesões tumorais induzidas pela 1,2-dimetilhidrazina e seu grau de atipia no colon de ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**. v. 13, n. 3, 1998.

LEBLANC, A. M.; PERDIGÓN, G. Yogurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer. **Medical Science Monitor**. v. 10, n. 4, p. 96-104, 2004.

LEITE, A. M. O. et al. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 44, n. 2, p. 341-349, 2013.

LIU, J.-R. et al. Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. **Nutrition and Cancer**. v. 44, n. 2, p. 183-187, 2002.

LOPITZ-OTSOA, F. et al. Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Revista Iberoamericana de Micologia**. v. 23, p. 67-74, 2006.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 193, p. 265-275, 1951.

MAGALHÃES, K. T. et al. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 42, p. 693-702, 2011.

MCMANNUS, J. F. A.; MOWRY, R. W. **Staining Methods. Histoologic and Histochemical**. New York: Medical Division of Harper & Brothers, 1960.

MEDDINGS, J. B. et al. Increased gastrointestinal permeability is an early lesion in the spontaneously diabetic BB rat. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**. v. 276, n. 4, p. 951-957, 1999.

MENDONÇA, J. N. et al. Padronização e validação de metodologia para verificação de permeabilidade intestinal utilizando cromatografia gasosa. **RBAC**. v. 41, n. 4, p. 271-274, 2009.

MOHANIA, D. et al. Anticarcinogenic effect of probiotic dahi and piroxicam on DMH-induced colorectal carcinogenesis in wistar rats. **American Journals of Cancer Therapy and Pharmacology**. v. 1, n. 1, 2013.

NEWELL, L. E.; HEDDLE, J. A. The potent colon carcinogen, 1,2-dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. **Mutation Research**. v. 564, p. 1–7, 2004.

OUWEHANDA, A. C. et al. Effect of probiotics on constipation, fecal azoreductase activity and fecal mucin content in the elderly **Annals of Nutrition and Metabolism**. v. 46, p. 159-162, 2002.

RIZK, S. et al. The antiproliferative effect of kefir cell-free fraction on HuT-102 malignant T lymphocytes **Clinical Lymphoma & Myeloma**. v. 9, n. 3, p. 198-203, 2009.

RODRIGUES, M. A. M. et al. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 34, p. 351-355, 2002.

SARKAR, S. Potential of kefir as a dietetic beverage – a review. **British Food Journal**. v. 109, n. 4, p. 280-290, 2007.

SCHWABE, R. F.; JOBIN, C. The microbiome and cancer. **Nature**. v. 13, p. 800-812, 2013.

SENGOTTUVELAN, M. et al. Modulatory influence of dietary resveratrol during different phases of 1,2-dimethylhydrazine induced mucosal lipid-peroxidation, antioxidant status and aberrant crypt foci development in rat colon carcinogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1760, p. 1175–1183, 2006.

SERBAN, D. E. Gastrointestinal cancers: Influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. **Cancer Letters**. v. 345, p. 258-270, 2014.

SHMUELY, H. et al. Probiotics in the prevention of colorectal cancer. **Currently Colorectal Cancer Reports**. v. 9, p. 31-36, 2013.

SMIRICKY-TJARDES, M. R. et al. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentative characteristics of growing pigs. **Journal of Animal Science**. v. 81, p. 2535-2545, 2003.

TEDELIND, S. et al. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**. v. 13, n. 20, p. 2826-2832, 2007.

TEIXEIRA, T. F. S. et al. Intestinal permeability measurements: general aspects and possible pitfalls. **Nutrición Hospitalaria**. v. 29, n. 2, p. 269-281, 2014.

UCCELLO, M. et al. Potential role of probiotics on colorectal cancer prevention. **BMC Surgery**. v. 12, n. 1, p. 1-8, 2012.

WHO. **World Health Organization**. Global health observatory: Cancer mortality and morbidity. 2014. Disponível em: [http://www.who.int/gho/ncd/mortality\\_morbidity/cancer/en/](http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en/). Acessado em: 22 de junho de 2015.

WU, N. et al. Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients. **Microbial Ecology**. v. 66, p. 462–47066, 2013.

ZHU, J. et al. *Lactobacillus salivarius* Ren prevent the early colorectal carcinogenesis in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat model. **Journal of Applied Microbiology**. v., 2014.

ZHU, Q. et al. The role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer. **Tumor Biology**. v. 34, p. 1285-1300, 2013.

## 7 CONCLUSÕES GERAIS

A sobrevivência das BAL presentes no kefir de leite integral diminui de forma expressiva quando estas são expostas à simulação das condições prevalentes no trato gastrointestinal humano. Já, às leveduras são pouco afetadas.

Com relação à capacidade do kefir de leite integral de reduzir o desenvolvimento das lesões pré-neoplásicas, induzidas quimicamente com DMH, no cólon de ratos Wistar, observamos que o consumo regular desse leite fermentado reduziu em 36,7 % a incidência dos FCA em comparação com o controle. Quanto aos mecanismos responsáveis por essa redução, encontram-se o aumento da produção dos AGCC totais e do propionato, a redução da permeabilidade intestinal e o aumento da concentração das enzimas do sistema antioxidante.

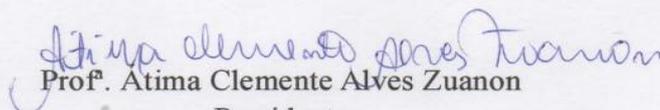
Dessa forma, conclui-se que a atividade de probiose do kefir de leite integral acontece em decorrência da ação sinérgica das BAL (células viáveis e não viáveis) e das leveduras, e dos compostos bioativos produzidos por eles durante o processo de fermentação. Assim, o consumo do kefir deve ser encorajado uma vez que o mesmo pode ser facilmente produzido em domicílio, possui baixo custo de produção e pode ajudar a melhorar a saúde do consumidor.

**ANEXO A – Certificado de Aprovação no CEUA/UFV****CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 84/2014, intitulado “Avaliação do efeito preventivo do consumo de kefir sobre o desenvolvimento de lesões pré-neoplásias, atividade antioxidante e morfometria de tecidos de ratos wistar”, coordenado pela professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio do Departamento de Nutrição e Saúde, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 04/12/2014, com validade de 12 meses.

**CERTIFICATE**

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 84/2014, named “Evaluation of the preventive effect of consumption of kefir on the development of pre-malignancies injury, antioxidant activity and morphology of tissue of Wistar rats”, is in agreement with the actual Brazilian legislation ( Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on December 04, 2014 valid for 12 months.

  
Prof. Atima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV