



AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM RESVERATROL E PROBIÓTICO

Emily Dardiane Soares Barbosa

Introdução

O trato gastrointestinal (TGI) possui dois papéis fundamentais na fisiologia humana: digestão e a manutenção da homeostase da resposta imune, além de abrigar grande diversidade de espécies bacterianas que colonizam o corpo humano e que exercem proteção ecológica intestinal, impedindo o estabelecimento das bactérias patogênicas [1]. A microbiota intestinal é benéfica para o hospedeiro quando se tem equilíbrio entre os efeitos recíprocos e as necessidades. Entretanto, a ocorrência de desequilíbrio neste ecossistema, como o fumo e ingestão de álcool pode resultar em doença [1].

Probióticos são conceituados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro. A influência benéfica destes sobre a microbiota intestinal humana inclui fatores como os efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência contra patógenos [2]. Algumas bactérias ácido-láticas (BAL) são bastante conhecidas por suas aplicações terapêuticas no tratamento e prevenção de várias doenças [3]. Dentre as BAL, *Lactococcus lactis* é a espécie melhor caracterizada, pois além de sua importância econômica, possui seu genoma completamente sequenciado e diversas ferramentas genéticas e de expressão já foram desenvolvidas para esta espécie [4].

O resveratrol é um composto fenólico, pertencente ao grupo dos flavonoides, que tem sido associado a inúmeras propriedades fisiológicas benéficas à saúde humana [5, 6]. Estudos recentes que envolveram tratamento oral com resveratrol demonstraram que este melhora a inflamação aguda do intestino delgado e estes resultados fornecem novos potenciais e opções de tratamento de profilaxia de pacientes com doenças inflamatórias dos intestinos [7, 8]. Assim, o presente estudo objetivou analisar os *Lactobacillus* presuntivos no trato gastrointestinal de camundongos tratados com *Lactococcus lactis* e resveratrol.

Material e métodos

Para realização dos experimentos foram utilizados 24 camundongos, fêmeas (entre 8-10 semanas) da linhagem C57BL/6 selvagens que foram divididos em 4 grupos aleatoriamente: Dieta padrão (DP), DP + *Lactococcus lactis* (DP + BAL), DP + resveratrol (DP + RSV), DP + *Lactococcus lactis* + resveratrol (DP + BAL + RSV).

O experimento teve a duração de 15 dias, em que nos primeiros quatro dias, os animais receberam o *Lactococcus lactis* ou o seu controle (caldo BHI) em um período do dia e resveratrol ou seu controle (salina) em outro período do dia. Nos 11 dias seguintes, os animais receberam somente o tratamento com resveratrol ou salina. Todos os tratamentos foram administrados por gavagem, através de uma cânula de ponta arredondada. No 16º dia foi realizado o sacrifício. A linhagem bacteriana empregada neste trabalho foi o *Lactococcus lactis subsp. Lactis*. Todos os animais ao término do tratamento foram sacrificados por decapitação em guilhotina.

Os órgãos: estômago, intestino delgado e intestino grosso foram retirados e lavados com salina fisiológica. Em seguida, estes lavados foram diluídos em salina fisiológica até chegar à proporção de 1:10000. Após a diluição, foi realizado o plaqueamento nas diluições 1:1000 e 1:10000. Uma alíquota de 10µL de cada diluição foi plaqueada em Placas de Petri contendo o meio de cultura sólido Ágar M17. Após esse procedimento, as placas foram armazenadas em estufa a 37°C para crescimento bacteriano. Após 24 horas de incubação, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias nas placas.

Os dados foram transferidos para o software *GraphPadPrism* (versão 5.0®) onde foram expressos como Média ± desvio-padrão do log das unidades formadoras de colônias (UFC) e as diferenças analisadas por análise de variância – ANOVA, seguido do teste de Tukey. O nível de significância foi previamente estabelecido em $p < 0.05$.

Resultados

Os principais achados deste estudo mostraram um aumento significativo de *Lactobacillus* presuntivos no estômago dos grupos DP+BAL ($6,59 \pm 0,04$ log UFC), DP+RSV ($6,63 \pm 0,03$ log UFC) e DP+BAL+RSV ($6,8 \pm 0,02$ log UFC) quando comparados ao grupo alimentado apenas com DP ($5,41 \pm 0,06$ log UFC). Destaca-se também que o grupo DP+BAL+RSV teve médias significativamente maiores que os outros grupos (DP, DP+BAL e DP+RSV).



Em relação às análises de *Lactobacillus* presuntivos no intestino delgado, o grupo DP+BAL ($5,32 \pm 0,11$ log UFC) teve média significativamente menor que grupos DP ($6,08 \pm 0,06$ log UFC), DP+RSV ($6,4 \pm 0,09$ log UFC) e DP+BAL+RSV ($6,3 \pm 0,06$ log UFC). O grupo DP+BAL+RSV teve médias significativamente maiores que os grupos DP e DP+BAL.

Já no intestino grosso houve um aumento significativo de *Lactobacillus* presuntivos apenas no grupo DP+RSV ($6,64 \pm 0,03$ log UFC) em relação aos outros grupos (DP ($5,64 \pm 0,06$ log UFC), DP+BAL ($5,56 \pm 0,09$ log UFC) e DP+BAL+RSV ($5,65 \pm 0,07$ log UFC)) (Fig. 1).

Discussão

O presente estudo mostrou que a administração de *Lactococcus lactis* e resveratrol, tanto separadamente quanto associados, levou a um aumento de espécimes bacterianas benéficas no estômago de camundongos. Estudos anteriores revelaram que o uso de culturas bacterianas probióticas estimulou a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais [9]. Um estudo realizado por Stefan Bereswill *et al.* [7], demonstrou que a administração oral de resveratrol protegeu camundongos do desenvolvimento de imunopatologias. Na avaliação do intestino delgado, a associação de *Lactococcus lactis* e resveratrol foi efetiva no aumento de *Lactobacillus* presuntivos em relação ao tratamento somente com *Lactococcus lactis*. Já no intestino grosso, apenas o tratamento com resveratrol aumentou o número de colônias de *Lactobacillus* presuntivos.

Atualmente, têm-se poucos registros na literatura sobre as alterações microbiológicas causadas pela administração do resveratrol e dos probióticos no organismo de camundongos. As propriedades anti-inflamatórias do resveratrol têm sido descritas em diversas doenças, no entanto, modelos experimentais de inflamação intestinal são escassos e a maior parte avalia o intestino grosso [7]. Somando-se a isso, a obtenção de respostas imunes supressoras antígeno-específica é um importante objetivo no desenvolvimento de tratamentos para doenças autoimunes, inflamatórias e gastrointestinais.

Conclusão

Verificou-se que a administração de resveratrol associado ao *Lactococcus lactis* mostrou-se efetiva na modulação da microbiota gastrointestinal, através do aumento de *Lactobacillus* presuntivos. No entanto, mais estudos ainda são necessários para avaliar o efeito metabólico e imunológico do resveratrol e do *Lactococcus lactis* as alterações na microbiota causadas por estes.

Referências

- [1] Brandt KG, Sampaio MC, Miuki CJ. Importância da microflora intestinal. *Pediatria (São Paulo)*. 2006;28(2):117-27.
- [2] Theophilo IPP, Guimarães NG. Tratamento com probióticos na síndrome do intestino irritável. *Com Ciências Saúde*. 2008;19(3):271-81.
- [3] Amdekar S, Dwivedi D, Roy P, Kushwah S, Singh V. Probiotics: multifarious oral vaccine against infectious traumas. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2010 Apr;58(3):299-306. PubMed PMID: 20100178.
- [4] Bolotin A, Wincker P, Mauer S, Jaillon O, Malarre K, Weissenbach J, et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome research*. 2001 May;11(5):731-53. PubMed PMID: 11337471. Pubmed Central PMCID: 311110.
- [5] Beaudeau JL, Nivet-Antoine V, Giral P. Resveratrol: a relevant pharmacological approach for the treatment of metabolic syndrome? *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2010 Nov;13(6):729-36. PubMed PMID: 20823772.
- [6] Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. 2006 Nov 16;444(7117):337-42. PubMed PMID: 17086191.
- [7] Bereswill S, Munoz M, Fischer A, Plickert R, Haag LM, Otto B, et al. Anti-inflammatory effects of resveratrol, curcumin and simvastatin in acute small intestinal inflammation. *PLoS one*. 2010;5(12):e15099. PubMed PMID: 21151942. Pubmed Central PMCID: 2997083.
- [8] Bujanda L, Garcia-Barcina M, Gutierrez-de Juan V, Bidaurragaga J, de Luco MF, Gutierrez-Stampa M, et al. Effect of resveratrol on alcohol-induced mortality and liver lesions in mice. *BMC gastroenterology*. 2006;6:35. PubMed PMID: 17105669. Pubmed Central PMCID: 1657014.
- [9] Rao RK, Seth A, Sheth P. Recent Advances in Alcoholic Liver Disease I. Role of intestinal permeability and endotoxemia in alcoholic liver disease. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2004 Jun;286(6):G881-4. PubMed PMID: 15132946.

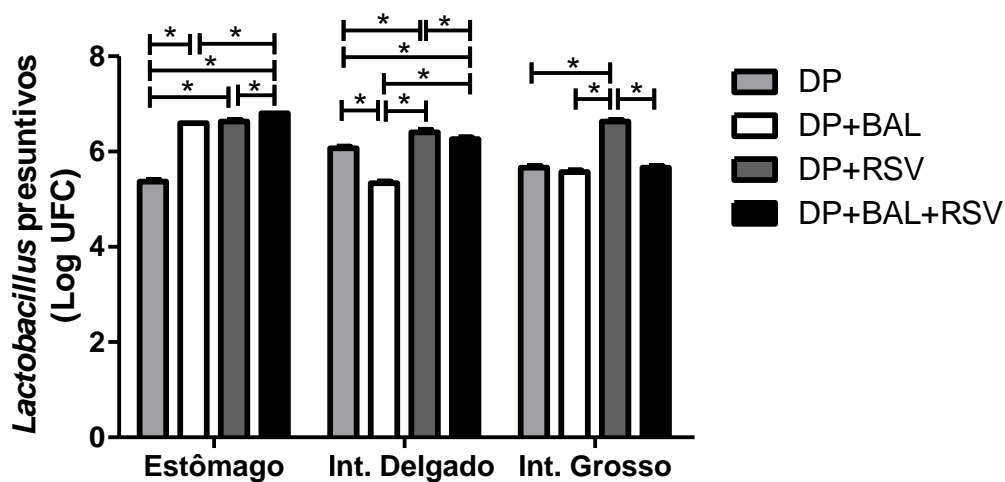


Figura 1. *Lactobacillus* presuntivos no trato gastrointestinal (estômago, intestino delgado e intestino grosso) de camundongos tratados com resveratrol e *Lactococcus lactis* (Log de unidades formadoras de colônias).