

Avaliação da ação probiótica do bacilo *Bifidobacterium animalis* (DanRegularis®) em doença inflamatória intestinal experimental aguda induzida em camundongos

Ana Elisa Silva Araújo

Caio Henrique Ferreira

Graduandos do curso de Nutrição, do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM)

Rafael Rodrigues Souza

Graduando do curso de Farmácia, do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM)

Kádima Nayara Teixeira

Débora Vieira

Daniela Resende de Moraes Salles

Docentes do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM)

Resumo: As DII ocorrem no mundo todo e representam sério problema de saúde pública, pois acometem preferencialmente pessoas jovens, cursam com recidivas frequentes e assumem formas clínicas de alta gravidade. Este estudo objetivou avaliar o resultado preventivo ou atenuado do probiótico *Bifidobacterium animalis*, registrado pela empresa Danone como DanRegularis, em colite aguda induzida experimentalmente em camundongos fêmeas. O modelo experimental que foi utilizado neste trabalho consistiu na indução de colite experimental por administração de ácido acético por via retal em camundongos isogênicos, fêmeas com 6 a 8 semanas, pertencente à linhagem Swiss, os quais foram mantidos durante o período experimental em gaiolas individuais. O estudo foi composto por 3 grupos, contendo 5 animais cada, sendo um grupo controle, um grupo tratado com probiótico e um grupo placebo, administrando solução de NaCl 0,9% p/v por via intragástrica. Foram avaliados o peso, características das fezes e pH fecal durante todo o período de experimento. O grupo controle apresentou-se saudável, dentro do esperado, sem nenhuma alteração nas características das fezes, pH médio de 7,45 e ganho de peso médio de 11,37% no período total de estudo. Avaliando o grupo placebo, o pH médio encontrado foi de 4,3, com uma perda de peso média de 3,21%, e média do escore do IAD foi de 2,03. Quanto ao grupo tratado, a média de perda de peso deste grupo foi de 3,02%, sendo semelhante ao grupo placebo. Após iniciar o tratamento, a média de ganho de peso foi igual a 5,69%. O pH médio foi de 6,7, e a média do escore de IAD ao final do estudo foi de 0,99. Portanto, o probiótico *Bifidobacterium animalis* comprovou ação benéfica na recuperação do processo inflamatório agudo na colite experimental.

Palavras-chave: Colite Experimental, Probióticos, Doença Inflamatória Intestinal

Abstract: IBD occurs worldwide and represent a serious public health problem, for it affects mainly young people, presents itself with frequent relapses, clinical forms and takes very serious forms. This study aimed to evaluate the result of preventive or reduced pro biotic *Bifido-*

bacterium animalis, filed by Danone as DanRegularis in acute colitis induced in female mice. The experimental model that was used in this study consisted of experimental colitis induced by acetic acid administration rectally in inbred mice, females with 6 to 8 weeks; parts of Swiss strain were kept during the experimental period in individual cages. The study consisted of three groups containing five animals each, with a control group, a group treated with probiotics and placebo groups, managing NaCl 0,9% w / v intragastrically. We evaluated the weight, fecal characteristics and fecal pH throughout the experiment period. The control group was healthy, as expected, with no change in stool characteristics, average pH of 7.45 and average weight gain of 11.37% in the total period of study. By assessing the placebo group, one could find that the average pH was 4.3, with an average weight loss of 3.21% and the average score of the DSI was 2.03. As for the treated group, the average weight loss for this group was 3.02% and was comparable to placebo. After starting treatment, the average weight gain was equal to 5.69%. The average pH was 6.7 and the average score of IAD at the end of the study was 0.99. Therefore, the probiotic *Bifidobacterium animalis*, has proven beneficial effect on recovery of acute inflammation in experimental colitis.

Keywords: Experimental colitis, probiotics, IBD.

Introdução

Em sua avaliação mais ampla, a doença inflamatória intestinal (DII) corresponde a um processo inflamatório envolvendo o trato gastrointestinal (TGI), seja ele agudo ou crônico (LANNA *et al.*, 2006). As DII ocorrem no mundo todo e representam sério problema de saúde pública, já que acometem preferencialmente pessoas jovens, cursam com recidivas frequentes e assumem formas clínicas de alta gravidade (SOUZA *et al.*, 2008).

De acordo com Araújo *et al.* (2009), retocolite ulcerativa idiopática (RCUI) e a doença do Crohn (DC) são as formas mais encontradas das doenças inflamatórias intestinais (DII), que se distinguem por inflamação crônica do intestino, de causa ainda não terminantemente esclarecida e em cuja patologia estão envolvidos fatores genéticos, ambientais e imunológicos.

Vinculado à microbiota, sabe-se que indivíduos com DII possuem alterações qualitativas e quantitativas; entretanto, nenhuma bactéria, isoladamente, pode ser responsável por desencadear o processo inflamatório. Além disso, existe uma alteração na permeabilidade da mucosa intestinal e resposta imunológica anormal, que ativa uma cascata imunoinflamatória, gerando uma lesão continuada da mucosa intestinal. A amplificação da resposta inflamatória é mais significativa que o evento inicial como causa da destruição tecidual e das alterações histológicas e funcionais características das DII (BURGOS, *et al.*, 2008).

Segundo Pinho (2008), apesar de o tubo digestivo todo ser amplamente dominado por bactérias, tem entre seus diversos segmentos uma grande variedade na concentração destas. A ocorrência de secreções ácidas e biliares no estômago e intestino delgado proximal e o aspecto de um trânsito mais acelerado colaboram para uma diminuição da quantidade de bactérias nestes segmentos.

O aumento da preocupação da população em conhecer as características dos alimentos que consomem tem levado ao desenvolvimento de produtos que buscam a saúde e o bem-estar, além de sua função de nutrição. Estes geram efeitos benéficos à saúde humana; aliados à ação nutricional são denominados funcionais (MACEDO et al., 2008).

Os probióticos são catalogados como alimentos funcionais à base de microrganismos vivos, que mudam benéficamente o animal hospedeiro, gerando o balanço de sua microbiota intestinal. A preponderância benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana adiciona fatores como efeitos contrários, competição e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência versus patógenos. Desse modo, o emprego de culturas bacterianas probióticas instiga a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento da propagação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (SAAD, 2006).

As espécies de microrganismos consideradas probióticas e as mais utilizadas são as espécies *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Essas espécies estão presentes em iogurtes, produtos lácteos fermentados ou como suplemento alimentar (CUPPARI, 2005). Destas, pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, destacam-se *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. animalis*, *B. longum* e *B. thermophilum* (SAAD, 2006).

Os probióticos podem ainda afetar patógenos por meio da síntese de bacteriocinas, de ácidos orgânicos voláteis e de peróxido de hidrogênio, ou atuar sobre o metabolismo celular, diminuindo a concentração de amônia no organismo e liberando enzimas, como a lactase. Seus resultados anticarcinogênicos podem ser atribuídos à inibição de enzimas pro-carcinogênicas ou à estimulação do sistema imunitário do hospedeiro. A administração de *Lactobacillus casei* foi relacionada com a indução de uma resposta antitumoral mediada por células T e pela ativação de macrófagos, assim sendo, com a supressão da formação de tumores de cólon em camundongos e a inibição de metástases pulmonares (COPPOLA; GIL-TURNES, 2004).

O mecanismo de ação dos probióticos não foi ainda totalmente esclarecido, ainda que tenham sido recomendados vários processos que podem atuar independentemente ou associados (COPPOLA; GIL-TURNES, 2004).

Diante disto este estudo visou avaliar o resultado preventivo ou atenuado do probiótico *Bifidobacterium animalis*, registrado pela empresa Danone como DanRegularis, em colite aguda induzida experimentalmente em camundongos fêmeas pertencentes à linhagem Swiss.

Material e métodos

5.1. Animais

O modelo experimental que foi utilizado neste trabalho consiste em camundongos (*Mus musculus*) isogênicos, fêmeas com 6 a 8 semanas, pertencente à linhagem Swiss (swiss webster), nascidas e mantidas no biotério do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). Os animais foram mantidos durante o período experimental em gaiolas individuais.

5.2. Dieta dos animais

Os animais foram alimentados com ração balanceada da marca comercial Nuvilab CR₁, a qual foi fornecida *ad libitum*.

5.3. Indução da doença inflamatória intestinal (DII)

Após sete dias de aclimação, induziu-se nos camundongos a inflamação intestinal induzida, por administração retal contendo ácido acético a 5% diluído em água (destilada).

5.4. Isolamento e cultivo dos bacilos *Bifidobacterium animalis* (DanRegularis®)

Os bacilos da espécie *Bifidobacterium animalis* foram isolados por meio da técnica de estriamento em placas contendo o meio de cultura ágar lactobacillus MRS (protease peptona: 10.00 g/L, extrato de carne: 10.00 g/L, extrato de levedura: 5.00 g/L, dextrose: 20.00 g/L, polisorbato 80: 1.00 g/L, citrato de amônia: 2.00 g/L, acetato de Sódio: 5.00 g/L, sulfato de magnésio: 0.10 g/L, sulfato de manganês: 0.05 g/L, fosfato dipotássio: 2.00 g/L, agar: 12.00 g/L), a partir do iogurte da marca comercial Activia® (Danone). As placas foram incubadas por 24 h a 37°C.

As colônias obtidas foram ressuspensas em solução salina (NaCl 0,9% p/v) e o número de bactérias será inferido por espectrofotometria, em comprimento de onda de 600 nm.

5.5. Grupos experimentais e delineamento do estudo

Grupo 01 – Controle: Foi composto por cinco camundongos fêmeas, pertencentes à linhagem Swiss. Os camundongos foram alimentados com ração em *pellets* da marca comercial Nuvilab CR₁. A ração e água filtrada foram fornecidas *ad libitum*. Esse grupo de animais não foi submetido à doença inflamatória intestinal experimental. Ao final do experimento os animais foram sacrificados para análise macroscópica do intestino.

Grupo 02 – Placebo: Foi composto por cinco camundongos fêmea pertencentes à linhagem Swiss. Os camundongos foram alimentados com ração em *pellets* da marca comercial Nuvilab CR₁ e água filtrada *ad libitum*. Após o quinto dia de aclimação, foi iniciado o processo de indução da doença inflamatória intestinal experimental. Após sete dias de indução da doença inflamatória intestinal, os animais receberam diariamente ração e água filtrada *ad libitum* e 0,1 mL de solução de NaCl 0,9% p/v por via intragástrica durante sete dias. Após esse período os animais foram sacrificados para análise macroscópica dos resultados.

Grupo 03 – Tratado: Foi composto por cinco camundongos fêmeas, pertencentes à linhagem Swiss. Os camundongos foram alimentados com ração em *pellets* da marca comercial Nuvilab CR₁ e água filtrada *ad libitum*. Após o quinto dia de aclimação, foi iniciado o processo de indução da doença inflamatória intestinal experimental. Após sete dias de indução da doença inflamatória intestinal, os animais receberam diariamente ração e água filtrada *ad libitum*, e 0,1 mL de suspensão contendo 10⁹ bactérias/mL

em NaCl 0,9% p/v, por via intragástrica, durante sete dias. Após esse período os animais foram sacrificados para análise macroscópica dos resultados.

5.6. Acompanhamento da instalação da doença inflamatória intestinal experimental

A evolução e instalação da doença inflamatória intestinal induzida experimentalmente nos camundongos foram avaliadas pela análise dos parâmetros que se seguem:

5.6.1. Avaliação da evolução de peso

Os animais foram pesados no primeiro dia de estudo, no quinto dia (dia de início da indução da doença inflamatória intestinal). Após a instalação da doença, os animais foram pesados diariamente para a determinação do índice de atividade da doença (IAD). O peso de cada animal foi aferido em balança eletrônica digital, com capacidade máxima de 500 g e sensibilidade de 0,1 g.

5.6.2. Avaliação da atividade da doença

Foi realizada com o emprego do IAD (índice de atividade da doença), baseado no sistema de pontuação de OSMAN et al. (2004), que pontua a porcentagem de perda de peso corpóreo, consistência das fezes e sangramento retal, graduando a gravidade da atividade numa escala de 0 a 4, como demonstrado na Tabela abaixo:

Escore do índice de atividade da doença*

Características clínicas	Escore				
	0	1	2	3	4
Porcentagem de perda de peso (%)	Nenhum	1-5	5-10	10-20	>20
Característica das fezes**	Normal	Fezes pastosas			Diarréia
Sangue vivo nas fezes	Negativo				Sangue vivo

* índice de atividade da doença= escore combinado de porcentagem de perda de peso, característica das fezes e presença de sangue vivo nas fezes.

** fezes de característica normal = bem formadas; fezes pastosas = fezes pastosas que não estão aderidas ao ânus; e diarréia = fezes líquidas que aderem ao ânus.

5.6.3 Avaliação do pH fecal

Foram coletadas as fezes dos animais dos três grupos de estudo, no primeiro dia de estudo, no sétimo dia de indução da doença inflamatória intestinal, sete dias após o tratamento com a suspensão de *Bifidobacterium animalis* e no dia do sacrifício. Essa avaliação foi realizada para registrar o grau de fermentação no cólon dos animais.

5.7. Sacrifício

No dia do sacrifício, os animais foram previamente anestesiados, via intramuscular, com uma solução de cloridrato de ketamina a 10% na dose de 0,25 mL para cada

200 g de peso do animal, associada a cloridrato de xilazina na dose de 0,1 mL por animal.

5.10. *Análise estatística*

Os dados obtidos foram analisados pelo cálculo da média dos grupos e posteriormente comparados.

5.11. *Aspectos éticos*

Este trabalho foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM).

Resultados e discussão

Foram estudados um total de 14 camundongos da linhagem Swiss pesando entre 34,7 e 51 gramas, sendo 5 do grupo controle, 5 do grupo tratado e 4 do grupo placebo, pois um animal deste grupo morreu na primeira semana do estudo, sem causa definida.

O grupo controle apresentou-se saudável, dentro do esperado, sem nenhuma alteração nas características das fezes, pH médio de 7,45 e ganho de peso médio de 11,37% no período total de acompanhamento do estudo. A Figura 1 mostra a variação média de peso dos animais, em que pode ser visualizado o ganho de peso corporal ao longo dos dias desde o início do experimento.

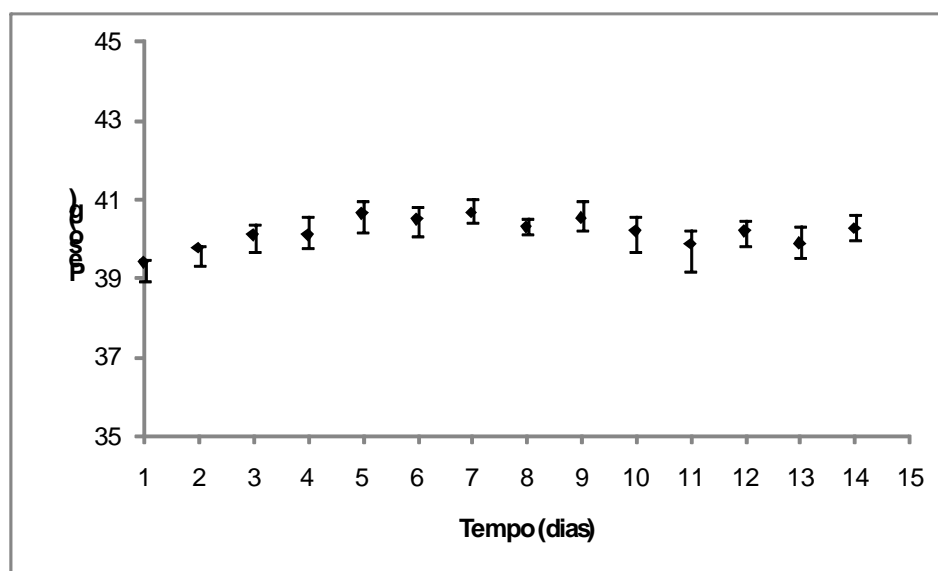


Figura 1: Evolução média de peso dos animais do grupo controle. As barras acima e abaixo das médias dos pesos em cada dia de experimento indicam o desvio padrão.

Com relação ao Índice de Atividade da Doença (IAD), não foi observado presença de sangue nas fezes em nenhum dos animais tanto do grupo tratado quanto do grupo placebo (não-tratado). Quanto à perda de peso foi verificada uma média de 3,02% de perda de peso do grupo tratado e 1,74% do grupo placebo, não havendo grande diferença entre os grupos, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Valores médios dos escores do índice de atividade da doença dos grupos tratado e placebo

	Grupo tratado	Grupo Placebo
% de perda de peso	1,2	1,0
Características das fezes	1,2	0,9
Sangue vivo nas fezes	0,0	0,0

Falando especificamente do grupo placebo, os camundongos receberam NaCl a 0,9% p/v. Ocorreram várias alterações na consistência das fezes, contendo fezes pastosas e diarreia devido à indução da doença inflamatória intestinal que se prolongou por todo o estudo, uma vez que este grupo não recebeu o tratamento adequado. O pH médio encontrado foi de 4,3, com uma perda de peso média de 3,21%, e a média do escore do IAD foi de 2,03 durante todo o período de acompanhamento deste estudo. Na Figura 2 pode-se observar a diminuição da média de peso corporal dos animais do grupo placebo nos quinze dias de estudo.

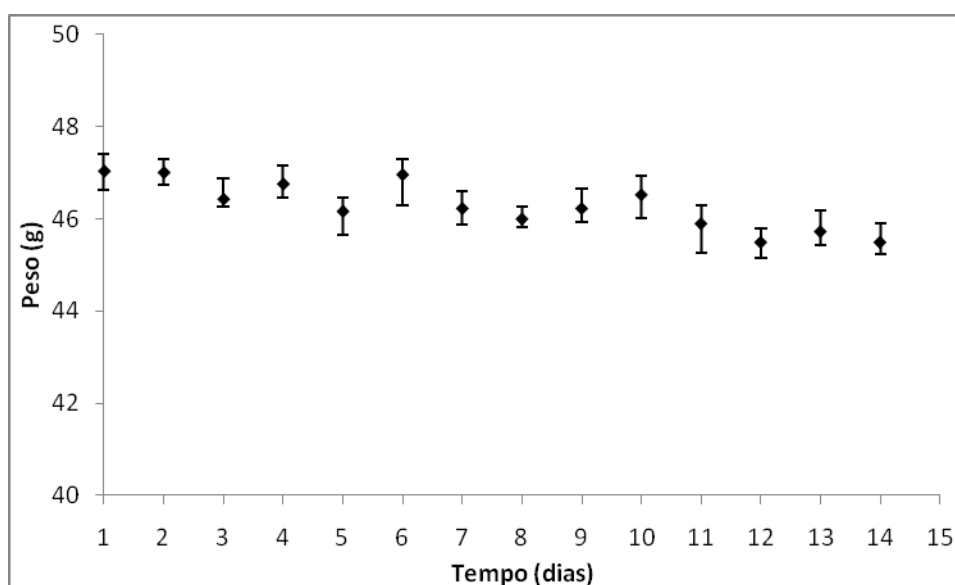


Figura 2: Evolução média de peso dos animais do grupo placebo. As barras acima e abaixo das médias dos pesos em cada dia de experimento indicam o desvio padrão.

Em relação ao grupo de camundongos que foi tratado com a bactéria *Bifidobacterium animalis*, este apresentou, após a indução da doença inflamatória intestinal, quadros agudos de diarreia que se estenderam até o início do tratamento com o probiótico. Após o início da introdução do probiótico, as fezes se tornaram menos líquidas e o ganho de peso foi retomado.

A média de perda de peso após a indução da doença deste grupo foi de 3,02%, sendo semelhante ao grupo placebo. Após o início do tratamento, a média de recuperação de ganho de peso foi igual a 5,69% do peso, conforme demonstrado na Figura 3. O pH médio foi de 6,7 e a média do escore de IAD ao final do estudo foi de 0,99. A maior perda média de peso ocorreu entre o 1.º e 4.º dias de indução da doença, e após o tratamento o ganho de peso foi considerável, indicando uma melhora do quadro patológico.

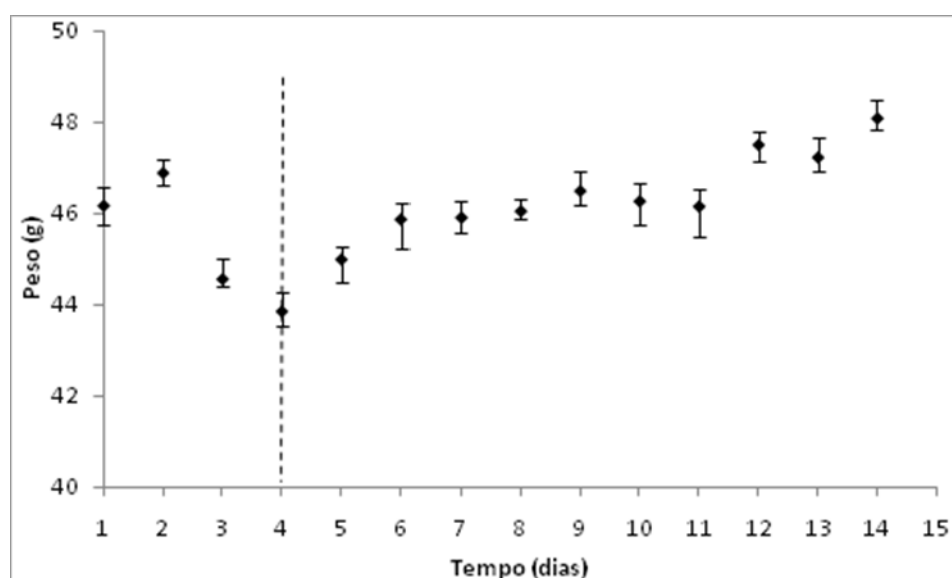


Figura 3: Evolução média de peso dos animais do grupo tratado. As barras acima e abaixo das médias dos pesos em cada dia de experimento indicam o desvio padrão. A linha tracejada indica o período de maior perda de peso corporal dos animais.

Ao avaliar o pH dos grupos estudados foi achado que no grupo Controle o pH fecal foi básico, resultado dentro dos padrões normais, já que a doença inflamatória intestinal não foi administrada no grupo. No grupo em que foi utilizado o placebo no tratamento da inflamação intestinal, o pH fecal foi bastante ácido, permanecendo assim por toda a pesquisa. E em relação ao pH das fezes do grupo tratado, após a indução da doença o pH manteve-se muito ácido por alguns dias, havendo uma melhora expressiva após a administração do probiótico, e o pH fecal tornou-se básico novamente.

De acordo com o estudo de Morais e Jacob (2006) os microrganismos probióticos alteram favoravelmente a flora intestinal, bloqueiam o crescimento de bactérias

patogênicas, geram digestão adequada, estimulam a função imunológica local e aumentam a resistência à infecção. Para ele, os lactobacilos e bifidobactérias auxiliam a manutenção de um balanço saudável da flora intestinal, por causar combinados orgânicos decorrentes da agilidade fermentativa, com formação de ácido lático, peróxido de hidrogênio e ácido acético, que aceleram a acidez do intestino, inibindo assim a multiplicação de bactérias com potencial de dano ao epitélio intestinal. Resultado semelhante ao relatado pelos autores foi encontrado em nosso estudo, em que o pH fecal ácido foi observado no momento que se instaurou a doença inflamatória intestinal.

Fazendo uma análise visual dos segmentos do intestino, o intestino dos camundongos tratados se assemelhava mais ao grupo controle, com cor rosa-avermelhada e brilhante, com apenas alguns pontos mais escuros, provavelmente demonstrando as lesões devido ao processo inflamatório da doença induzida, diferentemente dos animais que compunham o grupo placebo, que apresentaram lesões bastante visíveis em nível intestinal.

Estas lesões mostram a ocorrência do processo inflamatório de forma que o sistema imunológico se enfraquece, e as bactérias patogênicas se alojam na parede da mucosa intestinal, levando-o ao aumento da acidez, assim observado também quando se mediu o pH fecal.

A microbiota intestinal desempenha uma influência considerável sobre uma série de reações bioquímicas do hospedeiro. Em equilíbrio, evita que microrganismos potencialmente patogênicos nela presentes exerçam seus efeitos maléficos. Por outro lado, o desequilíbrio dessa microbiota pode resultar na proliferação de patógenos, com consequente infecção bacteriana podendo levar a diarreia, inflamação da mucosa, desordem de permeabilidade e ativação de carcinógenos no conteúdo intestinal (SANTOS & VALENTE, 2010).

Existem várias evidências de que as bactérias exercem um papel chave no aparecimento das doenças inflamatórias intestinais crônicas. Estudos experimentais demonstram a impossibilidade do desenvolvimento desta inflamação na ausência de bactérias, levando à ampla aceitação atual do aforisma “sem bactéria, não há colite”. Fundamentados nestes achados há muitos anos tenta-se identificar um possível agente causal das doenças inflamatórias intestinais (PINHO, 2008).

Nos dois grupos em que a doença foi induzida, os animais estavam mais agitados, estressados e com o abdômen edemaciado, sintomas que podem ser advindos da ação da doença inflamatória intestinal nestes grupos. O grupo tratado com o probiótico demonstrou uma grande melhora nestes sintomas ao final do estudo.

O andamento clínico, cujas revelações principais são diarreia, dor abdominal e sangramento retal, caracteriza-se por períodos de remissão e exacerbação, e apresenta complicações as mais diversas. Agregam-se, com certa frequência, manifestações extra-intestinais tais como articulares, cutâneas, oculares, hepatobiliares e vasculares, que podem preceder, acompanhar ou suceder a doença intestinal (LANNA, et al., 2006).

Conclusão

Dessa forma, tendo realizado vários testes no grupo experimental após ter induzido a doença inflamatória intestinal, observamos que houve uma melhora significativa no grupo tratado com o probiótico *Bifidobacterium animalis*, tanto em relação à recuperação do peso quanto à melhora do pH fecal, em relação ao grupo placebo.

Sugere-se a importância em realizar mais estudos complementares sobre a ação dos probióticos no processo inflamatório intestinal, para sua melhor utilização para o tratamento dessas enfermidades.

Referências bibliográficas

ARAÚJO, George Luíz de Souza; et al. Análise histológica e histoquímica de fatores prognósticos em pacientes com retocolite ulcerativa. *Revista Brasileira de Coloproctologia*. Rio de Janeiro. 2009, v. 29, n.1, p. 7-14.

BURGOS, Maria Goretti Pessoa de Araújo; et al. Doença inflamatórias intestinais: o que de novo em terapia nutricional? *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*. 2008; 23 (3): 184-189.

CUPPARI, Lilian. *Guia de nutrição: nutrição clínica no adulto*. 2 ed. Barueri: Manole, 2005.

COPPOLA, Mario de Menezes and Gil-Turnes, Carlos. Probióticos e resposta imune. *Ciência Rural*. Santa Maria. 2004. v. 34, n. 4, p.1297-1303.

LANNA, Cristina Costa Duarte; et al. Manifestações articulares em pacientes com doença de Crohn e retocolite ulcerativa. *Revista Brasileira de Reumatologia*. São Paulo. 2006, v. 46, pp. 45-51.

MACEDO, Renata Ernlund Freitas de [et al]. Desenvolvimento de embutido fermentado por *Lactobacillus* probióticos: características de qualidade. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas. 2008, v. 28, n. 3, p. 509-519.

MORAIS, Mauro Batista de; JACOB, Cristina Miuke Abe. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. *Jornal de Pediatria*. Porto Alegre. 2006, v. 82., n. 5, p. 189-197.

OSMAN, N; ADAWI, D; AHRNE, S.; JEPPSSON, B.; MOLIN, G. Modulation of the effects of dextran sulfate sodium-induced acute colitis by the administration of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Dig. Dis. Sci.* 2004; 49:320-7.

PINHO, Mauro. A biologia molecular das doenças inflamatórias intestinais. *Revista Brasileira de Coloproctologia*. 2008; 28(1): 119-123.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 2006 (42):1-16.

SALVIANO, Flávia Nunes; et al. Perfil socioeconômico e nutricional de pacientes com doença inflamatória intestinal internados em um hospital universitário. *Arquivos de Gastroenterologia*. Rio de Janeiro. 2008, v. 28, n. 3, pp. 99-106.

SANTOS, Anna Carolina Accioly Lins; VALENTE, Henyse Gomes. *Uso de probióticos na recuperação da flora intestinal*. 2010. 39 p. Monografia (Curso de Pós- Graduação *Lato Sensu*, título de Especialista em Terapia Nutricional) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2010.