

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Dissertação

Ação *in vivo* de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (R7) com potencial probiótico na estabilização de células cancerígenas no epitélio colorretal

Itiane Barcellos Jaskulski

Pelotas, 2018

Itiane Barcellos Jaskulski

Ação *in vivo* de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (R7) com potencial probiótico na estabilização de células cancerígenas no epitélio colorretal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, para cumprimento de requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dra. Simone Pieniz

Coorientador: Prof. Dr. Wladimir Padilha

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

J39a Jaskulski, Itiane Barcellos

Ação in vivo de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (R7) com potencial probiótico na estabilização de células cancerígenas no epitélio colorretal / Itiane Barcellos Jaskulski ; Simone Pieniz, orientadora ; Wladimir Padilha, coorientador. — Pelotas, 2018.

65 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Bactérias ácido lácticas. 2. Câncer colorretal. 3. Estresse oxidativo. 4. Resposta imune. I. Pieniz, Simone, orient. II. Padilha, Wladimir, coorient. III. Título.

CDD : 664

Itiane Barcellos Jaskulski

Ação *in vivo* de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (R7) com potencial probiótico na estabilização de células cancerígenas no epitélio colorretal

Dissertação apresentada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 05/03/2018

Banca examinadora:

Prof. Dr. Simone Pieniz. Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Ângela Maria Fiorentini Doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Anne y Castro Marques Doutora em Alimentos e Nutrição pela Universidade Estadual de Campinas

Resumo

JASKULSKI, Itiane Barcellos. **Ação *in vivo* de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (R7) com potencial probiótico na estabilização de células cancerígenas no epitélio colorretal.** 2018. 66p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Na última década, a ciência contribuiu significativamente para inúmeros avanços e progressos em relação ao tratamento e prevenção do câncer colorretal (CCR), porém, a prevalência global e taxa de mortalidade ainda permanecem altos. Há relatos sobre efeitos benéficos de espécies de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* com potencial probiótico na prevenção de CCR, no entanto, a bactéria probiótica *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* é comumente utilizada para fins industriais, não havendo comprovações *in vivo* sobre seu potencial anticarcinogênico. Visto o interesse emergente dos efeitos benéficos dos probióticos a fim de prevenir ou tratar o CCR, o presente estudo objetivou explorar os efeitos protetores de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* sobre o CCR. Ratos da linhagem Wistar receberam doses subcutâneas de 1,2 dimetilhidrazina (DMH), suspensão de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* por via oral e dieta hipercalórica. Após 20 semanas, os tecidos intestinais foram analisados histologicamente, além de controle ponderal e consumo de alimentos, parâmetros hematológicos e bioquímicos, estresse oxidativo e estado redox do tecido hepático. De acordo com o resultado, o isolado demonstrou potencial anticarcinogênico contra CCR, estabilizou o ganho de peso, reduziu adiposidade abdominal, apresentou ligeira melhora da resposta imune, exerceu atividade antioxidante frente ao estresse oxidativo e, demonstrou proteção à peroxidação lipídica. Estes resultados são promissores para a ciência frente às pesquisas relacionadas ao tratamento e prevenção de CCR.

Palavras-chave: bactérias ácido lácticas, câncer colorretal, estresse oxidativo, resposta imune.

Abstract

JASKULSKI, Itiane Barcellos. ***In vivo* action of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (R7) with probiotic potential in the stabilization of cancer cells in the colorectal epithelium.** 2018. 66p. Dissertation (Master in Food Science and Technology) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

In the last decade, science has contributed significantly to numerous advances and advances in treating and preventing colorectal cancer (CRC), but the overall prevalence and mortality rate remain high. There are reports on the beneficial effects of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species with probiotic potential in the prevention of CRC, however, the probiotic bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* is commonly used for industrial purposes, and there is no *in vivo* evidence for its anticarcinogenic potential. Given the emerging interest in the beneficial effects of probiotics in preventing or treating CRC, the present study aimed to explore the protective effects of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in the CRC. *Wistar* rats received subcutaneous doses of 1,2-dimethylhydrazine (DMH), suspension of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* orally and a hypercaloric diet. After 20 weeks, intestinal tissues were analyzed histologically, in addition to weight control and food consumption, hematological and biochemical parameters, oxidative stress and redox status of the hepatic tissue. According to the results, the isolate demonstrated anticarcinogenic potential against CRC, stabilized the weight gain, reduced abdominal adiposity, showed a slight improvement in the immune response, exerted antioxidant activity against oxidative stress and demonstrated protection of lipid peroxidation. These results are promising for science regarding the treatment and prevention of CRC.

Keywords: lactic acid bacteria, colorectal cancer, oxidative stress, immune response.

Lista de Figuras

Figura 1.	Diagrama representando as etapas de desenvolvimento do câncer e alguns agentes envolvidos.....	17
Figura 2.	Anatomia do intestino grosso humano.....	18
Figura 3.	Organograma de distribuição dos grupos experimentais.....	21
Figura 4.	Demonstração da técnica de gavagem para administração da bactéria.....	24
Figura 5.	Avaliação semanal do controle ponderal.....	25
Figura 6.	Peso dos órgãos	35
Figura 7.	Consumo de ração	37
Figura 8.	Estresse Oxidativo e Estado Redox.....	45
Figura 9.	Tecido intestinal sem alterações.....	51
Figura 10.	Tecido intestinal com alterações de atipia grau I	51
Figura 11.	Tecido intestinal com alterações de atipia grau II	52
Figura 12.	Tecido intestinal com alterações de atipia grau III.....	52
Figura 13.	Tecido intestinal com alterações de pólipos grau I.....	53

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Informações nutricionais das rações padrão e hipercalórica utilizadas no experimento	23
Tabela 2 – Protocolo de oxidação do ensaio de Reação ao Ácido Tiobarbitúrico.....	28
Tabela 3 – Ganho de Peso	32
Tabela 4 – Hemograma completo dos grupos experimentais	39
Tabela 5 – Determinação dos parâmetros bioquímicos realizados em todos os animais do experimento	42
Tabela 6 – Classificação das lesões diagnosticadas no epitélio colônico através da análise histológica.....	48

Sumário

1. Introdução.....	10
2. Objetivos.....	12
2.1. Objetivo Geral.....	12
2.2. Objetivos Específicos.....	12
3. Revisão de Literatura.....	13
3.1. <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	13
3.2. Fatores Alimentares e Ambientais Desenvolvimento de CCR	14
3.3. Câncer de Colorretal.....	15
3.3.1. Modelos Animais e Indutores de Câncer Colorretal	18
4. Material e Métodos	19
4.1. Material.....	19
4.2. Métodos.....	19
4.2.1. Ensaio Biológico	19
4.2.1.1. Ração Hipercalórica e Ração Padrão.....	22
4.2.1.2. Preparação e Administração de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	23
4.2.1.3. Indução do Câncer Colorretal por 1,2 dimetilhidrazina	24
4.2.1.4. Controle Ponderal.....	24
4.2.1.5. Eutanásia dos Animais.....	25
4.2.2. Parâmetros Hematológicos.....	25
4.2.3. Parâmetros Bioquímicos.....	26
4.2.3.1. Glicemia.....	26
4.2.3.2. Concentração de Colesterol Total.....	26
4.2.3.3. Concentração de Colesterol HDL	26
4.2.3.4. Concentração de Triglicerídeos	27
4.2.3.5. Transaminase Glutâmica Oxalacética.....	27
4.2.3.6. Transaminase Glutâmica Pirúvica.....	27
4.2.4. Avaliação do Estado Redox e Estresse Oxidativo	27
4.2.4.1. Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	28
4.2.4.2. Superóxido Dismutase (SOD).....	28
4.2.4.3. Catalase (CAT)	29

4.2.4.4. Determinação das Proteínas.....	29
4.2.5. Histologia das Células do Tecido Intestinal	29
4.2.7. Análises Estatísticas	30
5. Resultados e Discussão	31
5.1. Ensaio Biológico	31
5.1.1. Avaliação do Ganho Ponderal	31
5.1.2. Peso dos Órgãos	33
5.1.3. Consumo de Ração	36
5.2. Parâmetros Hematológicos.....	37
5.3. Parâmetros Bioquímicos.....	40
5.4. Avaliação do Estado Redox e Estresse Oxidativo	43
5.5. Análise Histológica do Tecido Intestinal.....	45
6. Conclusões	53
7. Referências.....	54

1. Introdução

Lactococcus lactis é um micro-organismo utilizado amplamente como iniciador na fabricação de diversos produtos lácteos. No entanto, nos últimos anos, surgiram evidências importantes as quais demonstram que cepas de *Lactococcus lactis* individualmente ou em combinação com outros micro-organismos probióticos, apresentam potencial benéfico para a saúde humana (Todorov et al., 2007; Suzuki et al., 2008), além de ser produtora de nisina, única bacteriocina aceita como conservante em produtos alimentares para o consumo humano no Brasil, permitida em queijos, requeijão, queijo fundido, queijos pasteurizados e queijo em pó (ANVISA 2003a; ANVISA 2003b; ANVISA 2003c; Cosentino et al., 2012).

As bactérias probióticas são definidas como suplementos dietéticos de micro-organismos vivos encontrados na microbiota normal com baixa ou nenhuma patogenicidade, com efeitos positivos sobre a saúde do hospedeiro, as quais podem resistir às condições do sistema digestivo humano e melhorar o equilíbrio da microbiota intestinal (Alvarez-Olmos & Oberhelman, 2001). Os benefícios de promoção da saúde atribuídos aos probióticos incluem atividade antimicrobiana contra patógenos intestinais, modulação do sistema imunológico, redução de níveis de colesterol no sangue, redução da colite e inflamação, prevenção de CCR, e regulação do metabolismo energético (Ambalam et al., 2016). Os probióticos possuem vários mecanismos de ação descritos, apresentando interferência bacteriana, em que a presença de um micro-organismo limita o potencial patogênico de outro (Chong, 2014).

Relatos na literatura sugerem uma associação entre fatores dietéticos, principalmente a ingestão de alimentos hiperlipídicos, com o risco aumentado de CCR (Devkota et al., 2012). A microbiota intestinal é dependente de resíduos alimentares que são produzidos pela digestão intestinal e absorção. O consumo de uma dieta equilibrada produz predominantemente resíduos de hidratos de carbono, tais como fibras, o que estimula a fermentação de sacarolíticos e a produção de ácidos graxos de cadeia curta e promotores de saúde (Waldecker et al., 2008). De forma contrária ao efeito causado por alimentos ricos em fibras, uma dieta com alta concentração de gorduras e proteínas de origem animal, pode favorecer o aumento da produção de ácidos biliares hepáticos, que funcionam como substratos para a geração de carcinógenos e promotores de CCR (Roberfroid et al., 2010), além de produzir metabólitos tóxicos e reduzir a hidrólise de fármacos (Nalini, Manju & Menon, 2006).

O câncer de colorretal (CCR) é considerado uma das principais causas da mortalidade em países ocidentais, estando entre os três tipos de cânceres mais incidentes tanto em homem quanto em mulheres, porém, ele é evitável diante de uma intervenção nutricional de forma preventiva incluindo agentes com potencial quimiopreventivos (Siegel et al., 2014).

O 1-2 dimetilhidrazina (DMH) é um indutor carcinogênico, amplamente utilizado para indução de CCR, o qual provoca hipermetilação do DNA das células do cólon (Hoffman-Goetz, 2003). A indução também ocorre por meio de um possível mecanismo no qual a microbiota intestinal venha a expressar agentes mutagênicos pela produção de ácidos biliares ou ativação de enzimas com efeitos mutagênicos presentes no intestino grosso (Manju & Nalini, 2007), que são semelhantes ao que ocorre com a alimentação constituída com alta concentração de gorduras e escassa em fibras.

Assim sendo, o presente estudo visa contribuir com a ciência na investigação acerca de bactérias com potencial probiótico, especificamente a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, na estabilização do câncer colorretal em humanos, visto que, há poucos relatos na literatura sobre os benefícios *in vivo* desta espécie.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar *in vivo* a ação de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* com potencial probiótico na estabilização de células cancerígenas induzidas no epitélio colorretal, utilizando como modelo biológico *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Avaliar o potencial anticarcinogênico de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* frente a células tumorais no epitélio colorretal;
- b) Analisar o efeito antioxidante de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*;
- c) Analisar os parâmetros hematológicos e bioquímicos resultantes da administração de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*;
- d) Analisar as alterações celulares malignas resultantes da interação da dieta hipercalórica associada à indução com DMH;
- e) Analisar os parâmetros hematológicos e bioquímicos resultantes da associação da dieta hipercalórica e indução com DMH;
- f) Avaliar o estresse oxidativo promovido por dieta hipercalórica e pela indução com DMH;
- g) Analisar morfológicamente as estruturas anatômicas do tecido intestinal de animais com e sem a ingesta de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

3. Revisão de literatura

3.1. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Bactérias ácido lácticas (LAB) têm um longo histórico quanto ao uso na produção de produtos alimentares fermentados. *Lactococcus lactis*, uma bactéria Gram-positiva, é a principal constituinte de culturas iniciadoras artesanais utilizadas em muitas indústrias para a fabricação de uma ampla gama de produtos lácteos fermentados, incluindo soro de queijo, queijos frescos e macios e, vários queijos rígidos e semi-curtidos. Essas culturas iniciantes desempenham um papel fundamental em determinação à qualidade desses produtos fermentados com respeito à vida útil, preservação e qualidade sensorial (González Revello et al., 2016). Devido à sua importância na indústria, *Lactococcus. lactis* têm sido objeto de numerosos estudos que elucidam a fisiologia e biologia molecular de traços relevantes para aplicação industrial, incluindo a produção de compostos aromatizantes e fatores que influenciam no crescimento celular e estabilidade (Leroy & Vuyst, 2004; Cavanagh, Fitzgerald & McAuliffe, 2015).

As bactérias ácido lácticas são conhecidas por sintetizarem peptídeos biologicamente ativos ou complexo de proteínas, como as bacteriocinas. Este micro-organismo produz bacteriocinas como lacticins, lactococcinas e nisina. A nisina é um peptídeo extracelular antagonista contra patógenos e micro-organismos deteriorantes, sendo o composto mais bem estudado entre as bacteriocinas, além de ser uma proteína de massa molecular baixa, dessa forma, é fácil separá-la entre aminoácidos durante a digestão, não influenciando com a microbiota do trato gastrointestinal. Além disso, a nisina constitui uma ampla atividade antimicrobiana contra micro-organismos patogênicos (Liu et al., 2005; Wardani et al., 2006).

Lactococcus lactis foi o primeiro organismo vivo a ser utilizado como organismo geneticamente modificado para o tratamento de uma ampla variedade de doenças. Por ser uma bactéria de fácil manuseio, não comensal, não patogênica e não invasiva, tem sido utilizada como vetor *in vivo* para antígenos e proteínas imunomoduladoras (Avery et al., 2015).

A sobrevivência e a passagem pelo trato gastrointestinal são importantes propriedades para estabelecer um organismo como probiótico e isso prova a capacidade deste em sobreviver às condições hostis do trato gastrointestinal, isto é, baixo pH do estômago, bile intestinal, enzimas proteolíticas na cavidade oral e intestino, dentre outras (Gruzza, Duval-Iflah & Ducluzeau, 1992; Schlundt, Saadbye & Lohmann, 1994; Grahn et al., 1994; Klijn,

Weerkamp, And de Vos, 1995; Kimoto et al., 1999; ; Kimoto, 2002; Kimoto et al., 2003; Kimoto et al., 2004). Outro critério importante para a seleção de bactérias probióticas é a aderência às superfícies celulares intestinais e, de acordo com Kimoto et al. (1999); Ouwehand et al. (1999); Lehto e Salminen (1997) *Lactococcus lactis* apresenta essa capacidade de aderência tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e além destes critérios, foi constatado que cepas de *Lactococcus lactis* possuem efeito hipocolesterolêmico, antidiabético e anti-mutagênico.

Haghshenas et al. (2014) demonstraram *in vitro* que metabólitos secretados por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 44Lac tem altas atividades anti-carcinogênicas em diferentes linhagens celulares carcinogênicas de origem epitelial, porém, não há estudos que comprovem seus reais efeitos anti-carcinogênicos *in vivo*.

Diversos estudos na literatura relacionam bactérias probióticas com a prevenção e/ou tratamento do CCR, apesar de não serem totalmente conhecidos os mecanismos pelos quais os probióticos exercem tal efeito, é passível que estes incluam: alteração na microbiota do intestino, inativação de compostos carcinogênicos, competição com a microbiota putrefativa e patogênica, melhoria da resposta imune do hospedeiro, efeitos antiproliferativos por meio da regulação da apoptose e diferenciação celular, fermentação de alimentos não digeridos e inibição de caminhos da sinalização de tirosina quinase (Bedani & Rossi, 2009; Denipote & Trindade, 2010; Calaça, Bezerra & Porto, 2017).

3.2. Fatores alimentares e ambientais no desenvolvimento de CCR

Alguns fatores aumentam significativamente o risco de desenvolvimento de CCR, incluindo maus hábitos alimentares, estilo de vida sedentarismo, obesidade, tabagismo e alcoolismo, predisposição genética e exposição a mutagênicos (Soares, 2016).

Dentre estes fatores, um dos mais importantes para o CCR é a gordura corporal, que muitas vezes é resultado do desequilíbrio entre a ingestão e o gasto de energia (Potter, 1999). Portanto, o excesso de ingestão de gordura na dieta associada à deposição de gordura corporal tem sido considerado um fator de risco convincente para a tumorigênese no cólon. De fato, uma dieta hiperlipídica e uma dieta hipercalórica podem resultar no aumento da endotoxemia, um fator desencadeante para respostas inflamatórias que promovem a carcinogênese (Ribas, 2012). O hábito alimentar brasileiro baseado em uma dieta ocidentalizada, caracterizada por uma grande abundância de carne vermelha (carne bovina,

porco, cordeiro, cabra), alimentos processados, gordura animal e baixo consumo de fibras têm sido relacionados ao risco de CCR (Baena & Salinas, 2015; Soares, 2016)

De acordo com O'Keefe (2009), a dieta influencia no risco de desenvolvimento de CCR e, este ser mediado pela microbiota por meio de seus metabólitos. O metabolismo no cólon ocorre quando alimentos não digeríveis, e/ou não digeridos, atingem o intestino grosso e são fermentados pelas bactérias residentes. A relação entre a dieta e o CCR pode ser, em parte, explicada pelas atividades da microbiota intestinal, nomeadamente por meio da fermentação proteolítica, dos aminoácidos aromáticos e dos glicídeos complexos e, pelo metabolismo dos ácidos biliares (Nagengast, 1995).

Da mesma forma que a microbiota intestinal pode ser um fator de risco é legítimo discutir que também pode ser modulada a favor do hospedeiro, limitando a abundância de patógenos, impedindo infecções promotoras da carcinogênese (Sears & Garrett, 2014), e promovendo o desenvolvimento precoce do sistema imunológico da mucosa intestinal. Neste sentido, modificações de hábitos alimentares e o consumo de probióticos, parecem ser estratégias terapêuticas promissoras no CCR (Lenoir, del Carmen & Cortes-Perez, 2016), em que alguns componentes da dieta são metabolizados pela microbiota intestinal simbiótica em componentes alimentares bioativos que podem prevenir o cancro (Bultman, 2016).

3.3. Câncer de Colorretal

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA, 2018) câncer é a denominação de um crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo. Estas células dividem-se rapidamente e tendem a serem agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas.

O conceito de CCR é a abrangência de tumores que acometem um segmento do intestino grosso (cólon) e o reto. Ambos têm a função de absorver a água que é ingerida com os alimentos e transformar a massa da substância ingerida e não aproveitada pelo corpo em fezes e eliminá-las. Sendo assim, os tumores que acometem estas regiões são chamados de câncer colorretais e tratados como uma única doença (Neves et al., 2005).

Na última década, a ciência contribuiu significativamente para inúmeros avanços e progressos em relação ao tratamento e prevenção do CCR, porém, a prevalência global e taxa de mortalidade ainda permanecem altos. De acordo com Ferlay et al. (2015), as

estimativas globais sobre a mortalidade por câncer apontam que o câncer de fígado e colorretal estão entre os seis tipos de câncer que mais matam no mundo, tanto em países desenvolvidos, quanto em desenvolvimento. O CCR é considerado o terceiro tipo de câncer mais comum no mundo em homens (746.000 casos, 10% do total) e o segundo em mulheres (614.000 casos, 9,2% do total) (Ferlay, 2012), sendo que cerca de 45% dos pacientes que recebem o diagnóstico de CCR, irão à óbito (Cobea et al., 2010). Na população brasileira, o CCR se destaca entre os mais frequentes nas mulheres, é o segundo mais comum, com 18.980 casos estimados para 2018 e, nos homens, ocupa a terceira posição, com 17.380 novos casos (INCA, 2018).

O desenvolvimento do câncer envolve três etapas: iniciação, promoção e progressão (Vincent & Gatenby 2008; Vineis, Schatzki, & Potter 2010). I. A iniciação refere-se a uma mutação irreversível no DNA logo após exposição a mutagênicos, tais como radiação ionizante, aminas aromáticas, hidrocarbonetos policíclicos e radicais livres de oxigênio (Pitot, 2001). II. A promoção é caracterizada por alterações na apoptose celular, inibindo indutores de apoptose, e na proliferação que ocorrem intrinsecamente em resposta ao início (por exemplo, superexpressão de p53 mutante) e/ou a promotores que impulsionam a proliferação e/ou inibem apoptose das células iniciadas (Croce, 2008). III. A progressão é caracterizada por mudanças estruturais na célula, acúmulo adicional de mutações genéticas, anaplasia, desenvolvimento de doenças malignas e neoplasmas, bem como invasão tumoral e crescimento metastático (Pitot, 2001; Croce, 2008) (Figura 1). Curiosamente, as células dentro do tumor primário são conhecidas por apresentar perfis de mutação heterogêneas que visam estratégias de tratamento mais difíceis (Capelozzi, 2009). Portanto, esforços significativos são realizados para inibir carcinogênese nas etapas de iniciação e promoção.

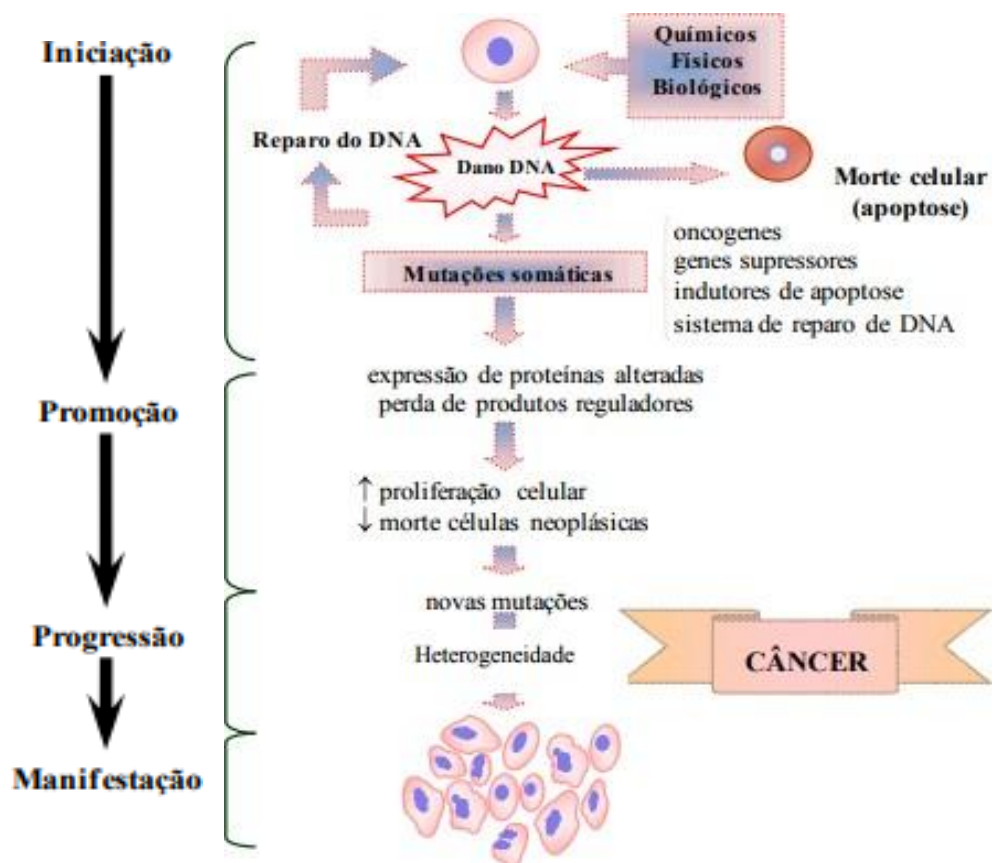


Figura 1. Diagrama representando as etapas de desenvolvimento do câncer e alguns agentes envolvidos. Fonte: Croce, 2008.

Do ponto de vista anatômico, o intestino grosso é formado pelos segmentos cólon e reto, onde o cólon possui quatro regiões: cólon ascendente, cólon transversal, cólon descendente e cólon sigmoide. Do sigmoide o intestino continua pelo reto e termina no canal anal (Hamill et al., 2002) (Figura 2).

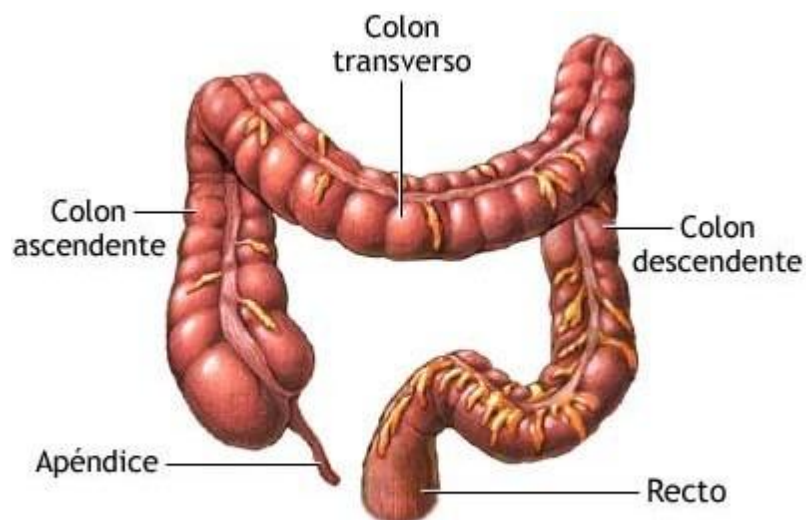


Figura 2. Anatomia do intestino grosso humano. Distinguem-se: apêndice, cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente e reto. Fonte: Hamill, 2002.

3.3.1. Modelos Animais e Indutores de Câncer Colorretal

Os modelos animais são indispensáveis para pesquisas relacionadas ao câncer, e a indução química é o método mais comumente utilizado para desenvolvimento do CCR (Hoffman-Goetz, 2003). Inicialmente, os experimentos em ratos com indução de neoplasias no cólon, eram realizados com o glicosídeo *cycasin* (Laqueur, 1965). Após, passou a ser utilizado os indutores sintéticos análogos, como o 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e Azoximetano (AOM). Estes produtos têm a propriedade de induzir neoplasias em ratos, camundongos, cobaias e macacos (Fiala, 1977; Thurnherr et al., 1973; Ward, 1974).

Vários estudos têm demonstrado que os ratos, os quais raramente desenvolvem câncer intestinal espontaneamente, são bons animais para a indução de tumores intestinais. Estes tumores, quimicamente induzidos, são semelhantes morfológica e histologicamente, aos encontrados em seres humanos (Youssef et al., 2015; Goel et al., 2016; El-Khadragy et al., 2018).

Os carcinógenos químicos são divididos em duas categorias: carcinógenos diretos, os quais são agentes alquilantes e possuem atividade eletrofílica intrínseca, e carcinógenos indiretos, que precisam sofrer modificações químicas no organismo antes de se tornarem eletrofílicos e ativos, sendo considerados protocarcinógenos. O DMH é um carcinógeno indireto, o qual é amplamente utilizado como carcinógeno colorretal, em razão da sua

estabilidade química e alta taxa de obtenção de tumores. O seu emprego neste estudo possibilitou comparações com a literatura, onde outros autores utilizaram DMH com o intuito de novas investigações acerca do CCR (Ohno et al., 2001; McIntosh, 2009; Bertkova et al., 2010; Kumar et al., 2012;). O DMH induz a proliferação de tumores no cólon em grande número, principalmente no sigmoide e reto, podendo, ocasionalmente, ocorrer ao redor da junção duodeno-jejunal (Celik et al., 1981; Glick, 1984). O DMH interfere, provavelmente, no processo de metilação do DNA via citocromo P450 (McGarrrity et al., 1988).

4. Material e Métodos

4.1. Material

Para a realização deste experimento, foi utilizado o micro-organismo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* com potencial probiótico, positivo à tolerância em condições ácidas, resistência a sais biliares e a tolerância ao trânsito gastrointestinal superior de forma simulada (dados não publicados), o qual foi previamente isolado de queijo ricota convencional. O isolamento foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos na faculdade de Nutrição – UFPel, em projeto de pesquisa paralelo a este.

Os modelos biológicos juntamente com os materiais de manutenção dos mesmos foram fornecidos pelo Biotério Central – UFPel e, o experimento *in vivo* foi desenvolvido no Laboratório de Nutrição Experimental, da Faculdade de Nutrição – UFPel.

As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Patologia, da Faculdade de Veterinária – UFPel.

4.2. Métodos

4.2.1. Ensaio Biológico

Foram utilizados modelos biológicos *Rattus norvegicus* de linhagem *Wistar* machos provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas, num total de 54 animais com cinco semanas de idade e peso corporal 200 a 250 g divididos em oito grupos experimentais, sendo distribuídos de cinco a oito animais por tratamento, conforme demonstrado na Figura 3, mantidos em caixas de polipropileno com grades de aço galvanizados com separadores em aço inox (60 x 50 x 22cm), em um ambiente com temperatura controlada (23 ± 2 °C) e luz controlada (12:12 horas ciclo escuro/claro).

A quantidade de animais foi determinada por planejamento estatístico, através de testes – ANOVA: Fixed effects, special, main effects and interações, o qual utiliza o número de tratamentos como base. O cálculo determinou um número de 6,75 animais por tratamento, justificando então a divergência da quantidade de animais por tratamento (cinco a oito).

Os animais foram mantidos em experimento durante 20 semanas após 10 dias de adaptação, sendo que as primeiras semanas após a adaptação foram induzidos à obesidade por meio da administração de dieta hipercalórica. Assim que os ratos obtiveram gordura acentuada (pesagem semanal), foi iniciada a administração da suspensão celular de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* por gavagem concomitante a administração de injeções de DMH. A suspensão celular foi preparada com solução salina na concentração de 10^{-8} Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/ mL (UFC/ mL) e administrada a quantidade de 1 mL. O DMH, foi preparado na concentração de 20 mg/ kg e administrado na quantidade de 1 mL/ kg. Ambas soluções foram preparadas no momento de uso, conforme descritas nos itens 4.2.1.2 e 4.2.1.3. Durante todo o experimento foi realizado o controle semanal do peso ponderal e a avaliação diária do consumo alimentar dos animais. Todos os animais receberam água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos em grupos conforme demonstrado na Figura 3:

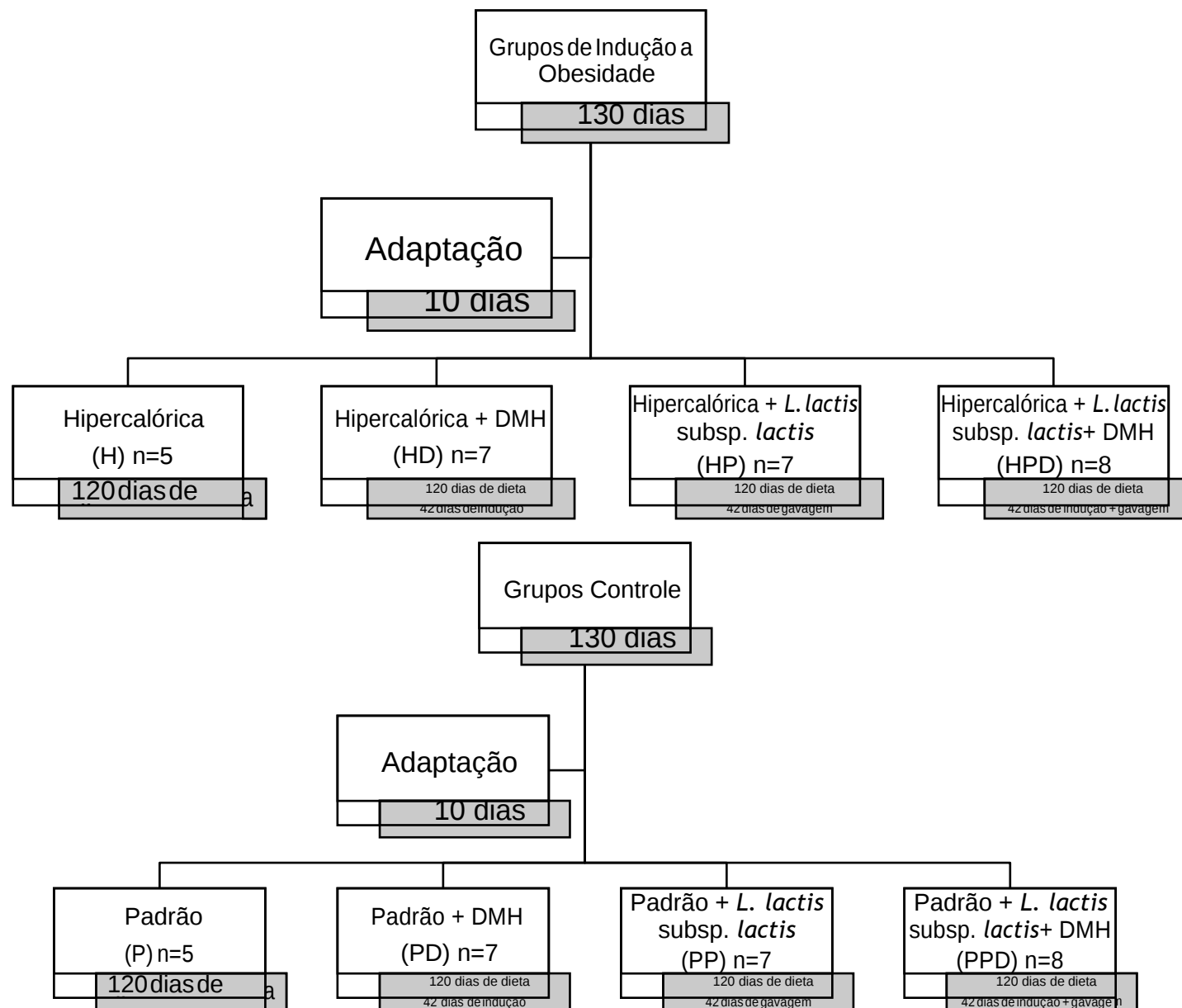


Figura 3: Organograma de distribuição dos grupos experimentais, separados em grupos de indução a obesidade e grupos controle.

Todos os procedimentos envolvendo modelos biológicos no presente estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) – UFPel e, durante o seu desenvolvimento, recebeu acompanhamento de médico veterinário responsável pelo Biotério da Faculdade de Nutrição – UFPel (Nº23110.007477/2016-40).

4.2.1.1. Ração Hipercalórica e Ração Padrão

A ração hipercalórica foi preparada de acordo com Souza et al. (2007) a qual consiste em alimentos altamente energéticos e ricos em gorduras, constituída por leite condensado (34%), ração padrão triturada (25%), amido de milho (23%), açúcar refinado (8%), óleo de soja (8%) e gordura animal (2%), a qual era preparada duas vezes na semana e mantida armazenada sob refrigeração para peletização e conservação. A ração padrão utilizada é uma ração comercial padrão (Nuvilab®), amplamente utilizada em experimentação biológica por ser considerada nutricionalmente equilibrada, fornecendo o aporte nutricional ideal para os animais.

A oferta de ração foi diária para os grupos específicos, totalizando 25 g para cada animal independente do tratamento. Segue a baixo, a tabela de informações nutricionais das rações (Tabela 1):

Tabela 1. Informações nutricionais das rações padrão e hipercalórica utilizadas no experimento.

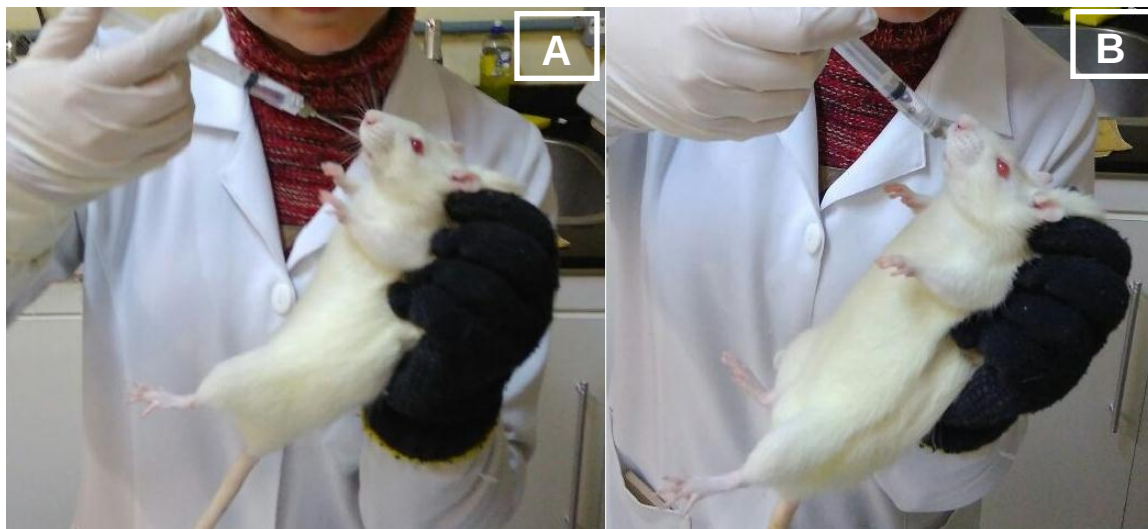
Descrição	Ração Hipercalórica***	Ração Comercial***
PB (%)	27,84	28,11
FDN (%)	13,64	16,35
FDA (%)	9,17	8,66
Lipídeos (EE) (%)	13,9	5,85
Cinzas (%)	8,36	8,41
Cálcio (%)	0,98	1,00
Fósforo (%)	0,88	0,86
Potássio (%)	1,21	1,20
Magnésio (%)	0,31	0,33
Enxofre (%)	0,25	0,30
CNF (%)	68,57	48,99
Energia Bruta (Kcal/Kg)*	4681,7	3610,50

*Cálculo baseado no manual da ANVISA (2005). PB (proteína bruta), FDN (fibra em detergente neutro), FDA (fibra em detergente ácido), EE (extrato etéreo), CNF (carboidrato não fibroso). ***Os dados da análise bromatológica são corrigidos para 100% de matéria seca.

4.2.1.2. Preparação e Administração de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Cada animal dos grupos tratamento com a bactéria probiótica recebeu diariamente a suspensão bacteriana por gavagem, durante seis semanas. Para isso, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* foi preparado de acordo com Orlando, Linsalata & Russo (2016) cultivado em Man Rogosa Sharpe (MRS) a 37 °C, e após 24 horas a leitura analisada em espectrofotômetro na densidade óptica (DO) de 600nm obtendo uma absorbância de 0,633nm. Após, o cultivo foi centrifugado, o sobrenadante descartado e o *pellet* celular lavado três vezes com soro fisiológico comercial. Posteriormente, as células foram ressuspensas em soro fisiológico e realizadas diluições consecutivas até a obtenção da concentração final de 1×10^8 UFC/ mL. Cada animal recebeu 1 mL desta suspensão por gavagem, a qual consistiu na introdução da substância no aparelho digestório por meio de uma agulha estomacal de 8

cm de comprimento, curvada e de ponta arredondada, a qual foi introduzida a boca do animal e gentilmente empurrada pelo esôfago até o estômago, sendo garantido o consumo de toda a suspensão pelo animal (Figuras 4).



Figuras 4. Demonstração da técnica de gavagem para administração da bactéria probiótica *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, onde pode-se observar a agulha utilizada para a técnica e seu tamanho (Figura 4A), e a agulha totalmente inserida no local correto de administração (Figura 4B).

4.2.1.3. Indução do Câncer de Colorretal por 1,2 Dimetilhidrazina

O CCR foi induzido por aplicações semanais de injeções subcutâneas de 1,2-dimetilhidrazina (Sigma, EUA). O DMH (20 mg/ kg) foi dissolvido em NaCl a 09% contendo 1,5% de EDTA como veículo, a concentração final foi de 20 mg/ mL e pH 6,5. Cada animal dos grupos de indução ao câncer recebeu as injeções (1 mL/ kg), durante seis semanas. As aplicações foram realizadas por médico veterinário treinado.

4.2.1.4. Controle de Peso Ponderal

O peso corporal dos animais dos oito grupos experimentais (n=54) foi determinado semanalmente, utilizando-se balança eletrônica digital (Marte Científica) com capacidade de 2 kg e sensibilidade de 0,1 g, durante as 20 semanas de experimento (Figura 5).



Figura 5. Avaliação semanal do controle ponderal.

4.2.1.5. Eutanásia dos Animais

Após as 20 semanas de experimento total e seis semanas de administração de probióticos por gavagem concomitante a administração de DMH por injeção subcutânea, os animais foram submetidos a um jejum de 3 horas e, posteriormente, sedados com isoflurano e eutanasiados por punção cardíaca, seguindo os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2004).

O trato gastrointestinal foi dessecado e armazenado em 10% de formalina tamponada. As amostras de sangue foram coletadas em tubos com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Os demais órgãos: baço, fígado, coração, gordura abdominal e rim, foram excisados e pesados individualmente para serem utilizados em análises complementares e/ou projetos futuros. Estes procedimentos foram realizados com auxílio de uma Médica Veterinária com conhecimento específico sobre as técnicas.

4.2.2. Parâmetros Hematológicos

Ao final do experimento, os animais tiveram o sangue coletado por punção cardíaca em tubos heparinizados. Os parâmetros hematológicos foram realizados em um Laboratório de Análises Clínicas da cidade de Pelotas-RS, com o intuito de avaliar as células sanguíneas dos diferentes grupos. Foi realizado hemograma veterinário por meio do método automatizado Pch-100iY constituído de eritograma, leucograma e contagem de plaquetas.

4.2.3. Parâmetros Bioquímicos

O sangue dos animais foi coletado sob jejum de 3 horas e realizada a separação do plasma por centrifugação das amostras a 2500 rpm durante 10 minutos. Os parâmetros de glicemia de jejum, colesterol total, colesterol HDL, triglicerídeos, transaminase glutâmica oxalacética (TGO), transaminase glutâmica pirúvica (TGP) e creatinina foram analisados.

4.2.3.1. Glicemia de jejum

A determinação dos níveis plasmáticos de glicose foi realizada em alíquotas de plasma (10 µL), utilizando método enzimático colorimétrico da glicose-oxidase (Labtest ®), de acordo com as instruções do fabricante. A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose formando peróxido de hidrogênio, o qual reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob a ação catalisadora da peroxidase, por meio de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra. A glicemia foi avaliada em animais sob jejum de 3 horas. Os resultados foram expressos em mg dL⁻¹.

4.2.3.2. Concentração de colesterol total

O colesterol total foi determinado pelo método enzimático colorimétrico de colesterol total em soro (Labtest ®), de acordo com as instruções do fabricante. Neste método, os ésteres de colesterol são hidrolisados pela enzima colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela enzima colesterol oxidase a colest-4-em-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimina que tem absorvidade máxima em 500 nm. A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração de colesterol na amostra. Os resultados foram expressos em mg dL⁻¹.

4.2.3.3. Concentração de colesterol HDL

O sistema para determinação do colesterol HDL foi realizado por meio da precipitação seletiva das lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL), por reação de ponto final. A dosagem foi realizada com ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio, que precipitam seletivamente e quantitativamente as VLDL e LDL. Após centrifugação, o

colesterol HDL foi determinado utilizando o sistema enzimático Colesterol Liquiform (Labtest ®) e quantificado espectrofotometricamente. Os resultados foram expressos em mg dL⁻¹.

4.2.3.4. Concentração de triglicerídeos

Para a determinação da concentração de triglicerídeos, foi utilizado sistema enzimático por reação de ponto final em soro (Triglicérides Liquiform Labtest ®) de acordo com as instruções do fabricante. Os triglicerídeos foram determinados por meio da lipoproteína lipase, a qual promove hidrólise dos triglicerídeos liberando glicerol, que é convertido pela ação da glicerolquinase em glicerol-3-fosfato. Este é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença de glicerolfosfato oxidase. Em seguida, ocorre uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase produzindo uma quinoneimina que tem máximo de absorbância em 505 nm. A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração de triglicerídeos na amostra. Os resultados foram expressos em mg dL⁻¹.

4.2.3.5. Transaminase Glutâmica Oxalacética

Para a determinação de transaminase oxalacética (TGO) foi utilizado o kit colorimétrico Transaminase TGO Bioclin ® de acordo com as instruções do fabricante, onde a Transaminase catalisa a transferência do grupamento Amino um Alfa-Aminoácido para um Alfa-Cetoácido. O Oxalacetato reage com a Dinitrofenilhidrazina. A intensidade de coloração da Hidrazona formada, em meio alcalino, é diretamente proporcional à quantidade de Oxalacetato, em determinado tempo, que por sua vez é função da atividade enzimática.

4.2.3.6. Transaminase Glutâmica Pirúvica

Para a determinação de transaminase pirúvica (TGP), foi utilizado o kit colorimétrico Transaminase TGP Bioclin ® de acordo com as instruções do fabricante, onde a Transaminase catalisa a transferência do grupamento Amino um Alfa-Aminoácido para um Alfa-Cetoácido. O Piruvato reage com a Dinitrofenilhidrazina. A intensidade de coloração da Hidrazona formada, em meio alcalino, é diretamente proporcional à quantidade de Piruvato, em determinado tempo, que por sua vez, é função da atividade enzimática.

4.2.4. Avaliação do Estado Redox e Estresse Oxidativo

A avaliação do estado redox foi analisado pelo método de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e o estresse oxidativo pelo sistema de defesa enzimático que compreende as enzimas Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT), conforme descrito a seguir. Análises foram realizadas em tecido hepático.

4.2.4.1. Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A Reação ao Ácido Tiobarbitúrico foi determinada de acordo com a metodologia de Ohkawa, Ohishi & Yagi (1979). Foi adicionado a cada tubo uma alíquota de Água Milli Q; amostra (fígado homogeneizado em solução salina na proporção de 1:10); Lauril Sulfato de Sódio (SDS) 8,1%; Tampão de Ácido Acético (pH 3,44), e Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 0,6% (pH 4,0), como demonstrado na Tabela 2. Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria a 100 °C por 1 hora.

Tabela 2. Protocolo de oxidação do ensaio da Reação ao Ácido Tiobarbitúrico.

TUBOS	H₂O Mili Q	Amostra	SDS (8,1%)	TAMPÃO (pH 3,44)	TBA (0,6%)
Branco	1300µL	500µL	200µL	500µL	_____
Amostra	800 µL	500µL	200µL	500µL	500µL

Fonte: Adaptado de Ohkawa et al. (1979).

Os produtos da reação foram determinados por medida de absorbância em 532nm, em espectrofotômetro. A concentração de TBARS foi calculada através de uma curva padrão, concentrações conhecidas de 1,1,3,3 – tetrametoxipropano, e os resultados foram expressos em nm de Malonaldeído (MDA)/g de amostra.

4.2.4.2. Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada por meio do método descrito por Klamt et al. (2001), quantificada em 60 µg das amostras de fígado homogeneizado, o qual foi incubado em 35 µL de tampão específico (pH 5,5) na presença de adrenalina a 37 °C. A absorbância foi monitorada por 60 segundos em 480 nm pela taxa de inibição da reação auto-catalítica adrenocromo, em solução tampão contendo 1mM de Madrenaline/50 glicina-NaOH (pH 10,2) / 1mM catalase. O resultado foi expresso em Unidade de SOD/ mg⁻¹ de proteína (U

SOD mg^{-1} / proteína) (uma unidade de atividade de superóxido dismutase é definida como a quantidade necessária para reduzir a velocidade da reação em 50%).

4.2.4.3. Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada conforme descrito por Aebi (1984) que se baseia no acompanhamento da decomposição de H_2O_2 determinada espectrofotometricamente a 240 nm. Amostras de fígado foram homogeneizadas e incubadas em um tampão específico na presença de peróxido de hidrogênio. Foram centrifugadas 300 μL de amostra, acrescentando-se 1 mL de tampão fosfato 14 mM com H_2O_2 (40 μL) a 100 μL do sobrenadante. A absorbância foi monitorada por 60 segundos em 240 nm. Os resultados foram expressos em unidades de atividade de catalase/ mg^{-1} de proteína (sendo uma unidade definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 μmol de H_2O_2 por minuto por mg de proteína).

4.2.4.4. Determinação de Proteínas

A quantidade de proteínas presentes no tecido hepático utilizado nas análises de CAT, SOD e TBARS foram mensuradas segundo metodologia de Lowry et al., (1951). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 700 nm.

4.2.5. Histologia das Células do Tecido Colorretal

Os tecidos intestinais dos 54 animais foram dissecados logo após a eutanásia e fixados em formaldeído tamponado a 10%. Estes tecidos foram subsequentemente corados com hematoxilina e eosina para posterior exame. As lesões encontradas foram preparadas conforme técnica convencional do Serviço de Histologia da UNIFESP (Larageira et al., 1998) e submetidas ao exame histológico por microscopia óptica em aumento de 5, 10 e 40 x (identificado em cada figura). As lesões foram classificadas conforme os critérios de atipia estrutural e atipia celular, preconizados por Inamori et al. (1987):

- ▶ Grau 0 - sem alterações de atipia, caracterizado pelo tecido epitelial íntegro.
- ▶ Grau I - alterações de atipia benignas e/ou suspeitas (o número de x, indica aumento no grau de malignidade), caracterizado por infiltrado de linfócitos e desorganização celular.

► Grau II - alterações suspeitas e/ou inconclusivas e/ou malignas (o número de x, indica aumento no grau de malignidade), caracterizado pelo encurtamento do epitélio; redução do número de células caliciformes e desorganização celular.

► Grau III - alterações malignas (o número de x, indica aumento no grau de malignidade), caracterizado pelo encurtamento do epitélio; necrose celular e células anaplásicas.

► Grau IV - alterações suspeitas e malignas (o número de x, indica aumento no grau de malignidade), caracterizado pelo encurtamento do epitélio, necrose celular, células anaplásicas e grande invasão de tecidos adjacentes.

► Pólipo – protuberância com aspecto vegetativo da mucosa intestinal; alteração benigna com potencial para malignização.

Atipias são consideradas alterações na forma, tamanho ou número das células e/ou das glândulas das criptas intestinais.

4.2.7. Análise Estatística

Para análise estatística utilizou-se análise de variância (two-way ANOVA) com auxílio do Software GraphPad Prism 6 para Windows para comparação entre os diversos parâmetros avaliados no experimento. Considerando-se diferença significativa para ANOVA, utilizou-se o Teste Tukey para verificar se os grupos diferiam entre si. Todos os testes foram realizados com significância estatística em nível de 5% ($p < 0,05$).

5. Resultados e Discussão

5.1. Ensaio Biológico

5.1.1. Avaliação do Ganho Ponderal

Os animais tiveram seu peso ponderal avaliado ao longo das semanas de experimento. Os resultados dos pesos dos animais estão apresentados em três diferentes períodos: peso inicial (com um dia de experimento); peso intermediário (com 60 dias de experimento) e peso final (com 130 dias de experimento). A distribuição dos animais por grupo foi realizada de forma aleatória e não tendenciosa, porém, mesmo havendo tentativa de distribuição homogênea, a média de peso inicial dos animais do grupo Padrão foi significativamente maior ($p < 0,05$), quando comparada aos grupos que receberam dieta Hipercalórica e dieta Hipercalórica + DMH. Os demais grupos demonstraram pesagem inicial semelhante.

Ao decorrer do experimento, com 60 dias, já observou-se expressivas alterações de peso. O grupo Padrão manteve-se com média de peso maior que o grupo Hipercalórica + Probiótico e observou-se ganho de peso significativo quando comparado aos grupos Padrão + DMH, Padrão + Probiótico + DMH, Hipercalórica + DMH e Hipercalórica + Probiótico + DMH (Tabela 3). O grupo Padrão + Probiótico teve um aumento de peso em relação aos grupos Padrão + DMH e Hipercalórica + DMH. O grupo Hipercalórica teve o seu peso equivalente ao grupo Padrão, diferentemente da pesagem inicial, e quando comparado aos grupos Padrão + DMH, Padrão + Probiótico + DMH, Hipercalórica + DMH, Hipercalórica + Padrão + DMH observou-se expressivo aumento de peso (Tabela 3). Os demais grupos não tiveram diferença significativa de peso entre si.

Ao realizar a pesagem final, última semana de ensaio biológico, observou-se que a média de peso do grupo Padrão foi significativamente maior quando comparada aos grupos Padrão + Probiótico, Padrão + DMH e Padrão + Probiótico + DMH, enquanto o grupo Hipercalórica teve um importante ganho de peso relacionado aos grupos Padrão + Probiótico, Hipercalórica + Probiótico, Padrão + DMH, Padrão + Probiótico + DMH, Hipercalórica + DMH e Hipercalórica + Probiótico + DMH (Tabela 3). O aumento de peso dos animais do grupo P em relação aos do grupo Padrão + Probiótico, demonstra que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* teve efeito positivo na estabilização do peso corporal e os grupos que receberam dieta Padrão + Probiótico apresentaram menor ganho de peso em relação aos demais. Observou-se um importante ganho de peso do grupo Hipercalórica em

comparação ao grupo Hipercalórica + Probiótico, onde a administração de probiótico neste grupo apresentou diferença de peso corporal de 15,5 % em relação ao peso corporal do grupo Hipercalórica. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) no peso final entre as médias dos grupos Padrão e Hipercalórica, porém, na pesagem inicial, o grupo Hipercalórica manteve-se com 4,38 % a menos que o grupo Padrão, resultando em uma diferença final de peso de 10,58 % a mais no grupo Hipercalórica. Quanto aos grupos que receberam a administração de DMH, não houve diferença significativa no ganho de peso entre os grupos (Tabela 3).

Este efeito na estabilização de ganho de peso nos animais dos grupos que receberam a suspensão de bactéria probiótica corrobora com resultado semelhante ao encontrado em estudo realizado por Zhang et al. (2017) onde os autores constataram que a administração de leite de soja enriquecido com probiótico (*Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum*) reduziu significativamente o ganho de peso corporal nos animais. Enquanto que Kumar et al. (2012), observaram aumento de peso significativamente maior em ratos alimentados com probiótico em comparação à ratos que recebiam DMH. Os autores relacionam esse aumento de peso à absorção aumentada de alimentos por grupos que receberam probiótico quando comparada aos que receberam o indutor químico.

Tabela 3. Ganho de peso dos animais de todos os grupos do ensaio biológico, ao longo de 130 dias.

Grupo	Ganho de Peso (g)
P*	242,2 ± 12,8
PP	169,4 ± 5,7
H	348,0 ± 10,1
HP	193,0 ± 9,3
PD	170,8 ± 4,6
PPD	145,2 ± 11,4
HD	193,0 ± 9,4
HPD	181,4 ± 9,1

*P: Padrão; PP: Padrão + Probiótico; H: Hipercalórica; HP: Hipercalórica + Probiótico; PD: Padrão + DMH; PPD: Padrão + Probiótico + DMH; HD: Hipercalórica + DMH; HPD: Hipercalórica + Probiótico + DMH. Valores expressos em média ± desvio padrão.

5.1.2. Peso dos Órgãos

O peso dos órgãos pode estar relacionado com o peso corpóreo do animal, bem como a atividade metabólica (Ferreira, Filho & Muniz, 2000). Os resultados obtidos dos pesos dos órgãos dos grupos experimentais estão apresentados na Figura 6.

A avaliação do peso do baço não demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$) em nenhum dos grupos analisados (Figura 6A). De acordo com Junqueira & Carneiro (2008) o baço é um importante órgão de defesa contra micro-organismos patogênicos. Como os demais órgãos linfáticos, o baço origina linfócitos que adentram o sangue circulante. Oliveira (2008) encontrou divergência de tamanho do baço de animais que receberam leite fermentado enriquecido com probiótico, porém, relacionou essa alteração com o peso dos animais, uma vez que o mesmo possuía um menor incremento de peso e uma menor média de peso corporal. Em semelhança ao presente estudo, Ngongang (2016) não encontrou diferença no peso do baço em ratos *Wistar* que receberam iogurte probiótico (contendo *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium*) e dieta hiperlipídica.

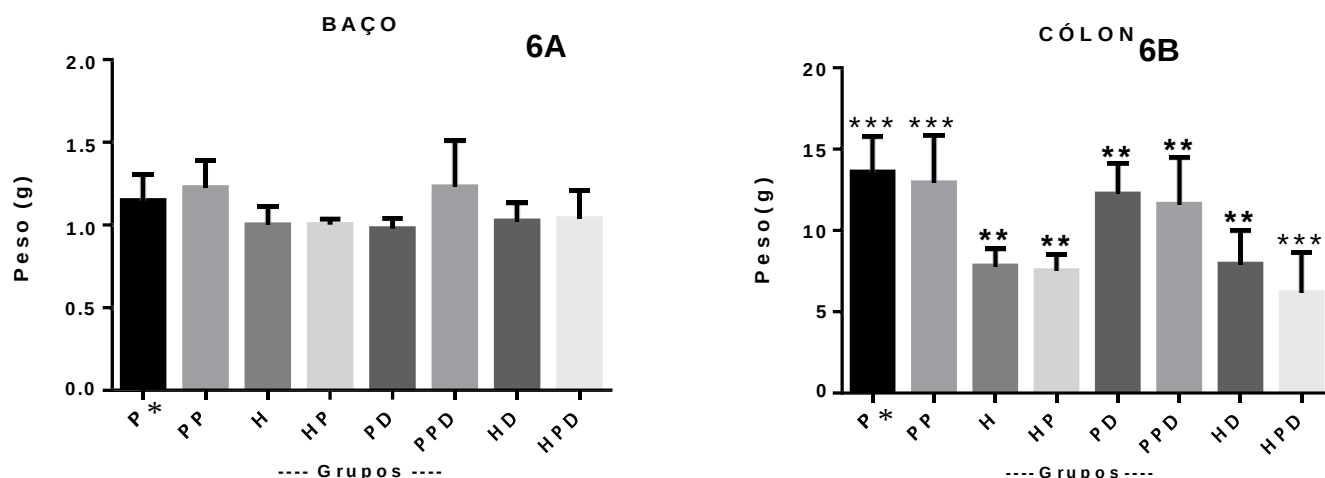
Referente ao peso do cólon dos animais (Figura 6B), os grupo Padrão, Padrão + Probiótico, Padrão + DMH e Padrão + Probiótico + DMH apresentaram peso significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparados ao peso dos grupos Hipercalórica, Hipercalórica + Probiótico, Hipercalórica + DMH, e Hipercalórica + Probiótico + DMH, não havendo diferença significativa entre estes (Padrão, Padrão + Probiótico, Padrão + DMH e Padrão + Probiótico + DMH) ($p > 0,05$). Estes resultados demonstram que os animais que receberam dieta hipercalórica apresentaram peso do cólon inferior aos demais, isso pode ser explicado pelo conteúdo cecal. O cólon foi pesado de forma íntegra, não havendo a possibilidade de manipulação para não danificar o tecido, pois o mesmo seria analisado histológica e morfologicamente.

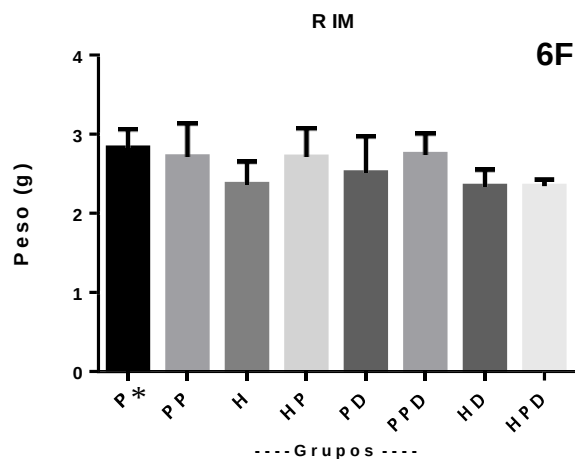
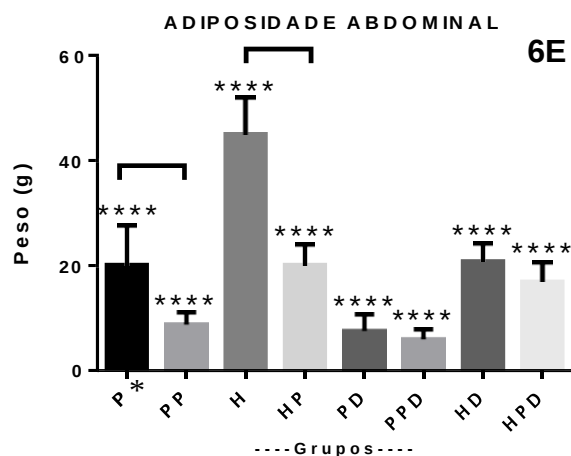
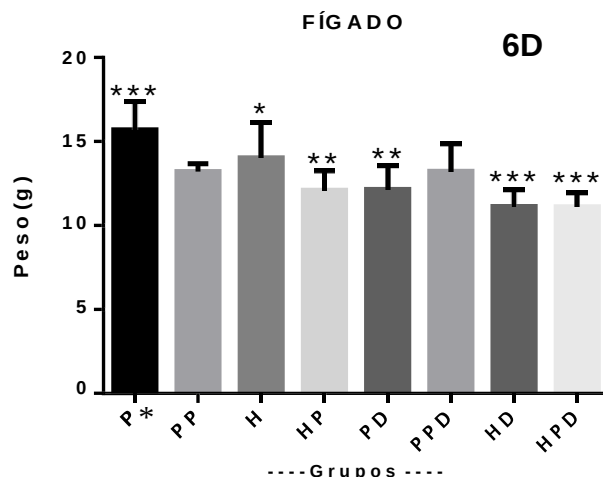
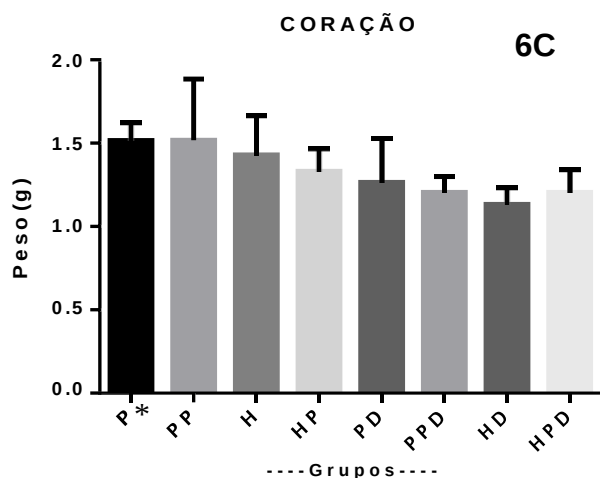
Na Figura 6C está demonstrado o peso do coração, na qual não foi observada diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$), demonstrando que a administração de dieta hipercalórica, administração da bactéria probiótica e/ou o DMH, não afetaram o peso do órgão.

Pode-se observar na Figura 6D que a média de peso do fígado no grupo Hipercalórica (H) foi significativamente superior ($p < 0,05$) quando associado ao grupo administrado probiótico juntamente com o indutor (Hipercalórica + Probiótico + DMH) e ao grupo administrado somente o indutor (Hipercalórica + DMH), o que pode-se sugerir uma atividade

metabólica aumentada por parte do órgão, devido à presença do indutor químico. Os hepatócitos são responsáveis por diversos processos importantes no organismo, como as reações de oxidação, metilação e conjugação, necessárias para a inativação e detoxificação de certas substâncias antes de sua excreção (Junqueira & Carneiro, 2008).

No Figura 6E observa-se uma discrepância na média de adiposidade abdominal do grupo que recebeu dieta Hipercalórica, sendo significativamente maior ($p<0,05$) quando comparada aos demais grupos analisados. O grupo Padrão teve resultado significativamente superior ($p<0,05$) quando relacionado ao grupo Padrão + Probiótico, demonstrando a eficácia da bactéria probiótica sobre o acúmulo de adiposidade abdominal. A diferença significativa ($p<0,05$) entre os grupo Hipercalórica e Hipercalórica + Probiótico, confirma esta hipótese. O excesso de adiposidade abdominal influencia diretamente no metabolismo e no risco cardiometabólico por meio de alterações na secreção de adipocinas (Savcheniuk et al., 2014). Kadooka et al. (2010) demonstraram o efeito de probiótico na redução da adiposidade abdominal e peso corporal em seres humanos, sugerindo uma influência benéfica de probióticos sobre distúrbios metabólicos.





Figuras 6. Peso dos órgãos. Estimativa de média do peso dos órgãos dos animais de todos os grupos experimentais: baço (A), cólon (B), coração (C), fígado (D), gordura abdominal (E) e rim (F). Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. *P: Padrão; PP: Padrão + Probiótico; H: Hipercalórica; HP: Hipercalórica + Probiótico; PD: Padrão + DMH; PPD: Padrão + Probiótico + DMH; HD: Hipercalórica + DMH; HPD: Hipercalórica + Probiótico + DMH. *: $p < 0,05$. **: $p < 0,005$. ***: $p < 0,005$. ****: $p < 0,00005$.

Nos grupos que receberam DMH, foi observada menor concentração de adiposidade da região abdominal, o que pode estar relacionado com o peso corpóreo do animal, visto que os animais destes grupos possuíam uma média de peso inferior aos demais, ao final do experimento.

Em relação ao peso do rim, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos, sugerindo uma função renal sem alterações, independente das dietas ou tratamentos

submetidos. Dentre as funções desempenhadas pelo rim, está a excreção de resíduos do metabolismo e substâncias tóxicas presentes no organismo por meio da urina (Guyton & Hall, 2002).

5.1.3. Consumo de ração

O resultado da média de consumo de ração está demonstrado na Figura 7. Observa-se que os animais que receberam dieta Padrão ingeriram significativamente quantidade maior ($p<0,05$) de ração em comparação aos grupos Hipercalórica + Probiótico, Hipercalórica + DMH e Hipercalórica + Probiótico + DMH. No grupo Padrão + Probiótico observou-se ingestão elevada em relação aos grupos Hipercalórica + DMH (HD) e Hipercalórica + Probiótico + DMH ($p<0,05$). A média de consumo do grupo Hipercalórica foi significativamente maior ($p<0,05$) em relação aos grupos Hipercalórica + DMH e Hipercalórica + Probiótico + DMH. Ainda, não foi observada influência na ingestão de dieta padrão e/ou hipercalórica na média de consumo dos grupos que receberam a suspensão da bactéria probiótica (Padrão + Probiótico, Hipercalórica + Probiótico e Padrão + Probiótico + DMH), em contrapartida, os grupos que receberam dieta hipercalórica juntamente com a administração de DMH (Hipercalórica + DMH e Hipercalórica + Probiótico + DMH) demonstram uma menor ingestão de ração, porém não foram significativos em comparação ao grupo Hipercalórica + Probiótico, demonstrando que o DMH não influenciou no consumo alimentar.

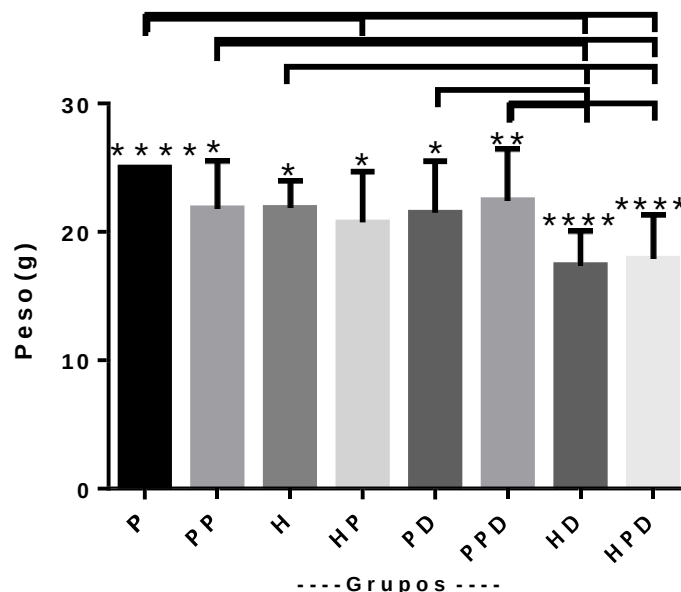


Figura 7. Consumo de ração. Demonstração da ingestão de ração pelos animais entre os grupos experimentais, mensurados diariamente. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. *P: Padrão; PP: Padrão + Probiótico; H: Hipercalórica; HP: Hipercalórica + Probiótico; PD: Padrão + DMH; PPD: Padrão + Probiótico + DMH; HD: Hipercalórica + DMH; HPD: Hipercalórica + Probiótico + DMH. *: $p<0,05$. **: $p<0,005$. ***: $p<0,005$. ****: $p<0,00005$.

5.2. Parâmetros Hematológicos

Foram analisados diversos parâmetros hematológicos relacionados às hemácias e leucócitos, além do número de plaquetas (Tabela 4). Por meio da análise destes parâmetros pode ser avaliada a saúde geral dos indivíduos. Para a análise dos dados, foi utilizado como comparativo valores de referência hematológicos específicos para ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*) com padronização de valores realizada pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (2005). O eritrograma avalia os eritrócitos, também chamados de hemácias ou glóbulos vermelhos, que correspondem a camada sedimentada após centrifugação do sangue que dá a coloração vermelha (sob responsabilidade da proteína hemoglobina presente), enquanto o hematócrito estima o volume de sangue ocupado pelos eritrócitos em relação ao total sanguíneo. Estes eritrócitos são responsáveis por parâmetros relacionados à anemia (Lorenzi, 2003; Aboderin & Oyetayo 2006). De acordo com o resultado demonstrado da série vermelha do sangue (eritrograma, hematócrito e hemoglobina) está claro que as dietas, a bactéria probiótica e o indutor carcinogênico não interferiram nestes parâmetros. Em relação ao Valor Corpuscular Médio (VCM) e Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), os grupos que receberam dieta hipercalórica demonstraram valores abaixo dos referenciados. Porém, não caracteriza-se alteração hematológica, visto que os valores foram aproximados aos valores de referência e, a hemoglobina destes está dentro dos parâmetros.

Em relação a série branca do sangue, onde estão inseridos leucócitos, bastonetes (neutrófilos), segmentados, eosinófilos, linfócitos e monócitos foi observado algumas diferenças quando comparados com os parâmetros de referência utilizados. A série branca é responsável pela defesa do organismo contra infecções. Os bastonetes, que correspondem ao número de neutrófilos, respondem pela fagocitose de micro-organismos patogênicos nas primeiras horas de contato com o tecido (Lorenzi et al., 2003). Os eosinófilos estão envolvidos contra parasitas e modulação de processos inflamatórios. Os monócitos além de possuir função de célula apresentadora de antígenos para os linfócitos se diferem em

macrófagos teciduais fagocitando protozoários, bactérias, vírus e células senescentes (Junqueira & Carneiro 2008). Já os linfócitos são responsáveis por reconhecer moléculas estranhas, participando da defesa imunológica do organismo. No presente estudo, pode-se observar que os bastonetes, eosinófilos e monócitos estão elevados em todos os grupos experimentais, este resultado sugere que não há relação com a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* pois os grupos que não a receberam este também demonstraram resultados elevados. Supõe-se que ocorra alguma divergência entre a padronização dos valores de referência, levando-se em consideração que, os animais apresentavam-se aparentemente saudáveis e que os locais de manutenção e proveniência dos animais foram diferentes dos autores de referências, o que pode causar alterações de homeostase (Lima et al., 2014). Os linfócitos se mostraram alterados somente no grupo Padrão + Probiótico + DMH, o que pode sugerir uma alteração positiva da resposta imune pela ação da bactéria probiótica. Há relatos na literatura demonstrando que as bactérias probióticas apresentam efeitos imunoestimulantes tanto em animais quanto em seres humanos, o que pode estar relacionado à capacidade destas bactérias em interagirem com Placas de Peyer e células epiteliais intestinais, estimulando a produção de imunoglobulina A (IgA) (Oliveira, 2017). Os probióticos poderiam também favorecerem a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos, sugerindo uma ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune (Gill & Cross, 2002).

Observa-se que as plaquetas apresentaram alterações nos grupos Padrão e Padrão + Probiótico, estando abaixo dos parâmetros referenciados. As plaquetas são responsáveis pela promoção da coagulação sanguínea e auxiliam na manutenção da integridade vascular (Rang et al., 2004). Valor abaixo do limite esperado é conhecido como plaquetopenia, o que pode estar relacionado com diversas doenças e um dos primeiros sintomas é a hemorragia. Ressalta-se que os animais destes grupos não apresentaram tal sintoma, não evidenciando a doença.

Tabela 4. Hemograma completo dos animais dos grupos experimentais aos 130 dias.

Parâmetros (unid.)	P*	PP	PD	PPD	H	HD	HPD	HP	REF 1** (n 28)	REF 2*** (n 23)
---- média ± desvio padrão ----										
Eritrograma (10 ⁶ /μL)	9,33±0.03	9,18±0.01	9,09±0.45	8,72±0.19	8,74±0.61	8,7±0.36	8,65±0.74	8,93±0.40	3,3 – 8,3	6,7 – 8,6
Hemoglobina (g/dL)	16,0±0.74a	15,6±0.56b	16,0±0.42a	15,1±0.28b	14,6±0.33c	14,2±0.14c	14,05±1.06c	15,05±0.91b	7,2 – 16	12,8 – 15,9
Hematócrito (%)	45,8±0.37	45±0.28	45,05±0.91	43,3±1.41	40,5±0.52	40,5±0.07	40,65±3.18	42,7±2.54	28 – 50	39,1 – 48,7
R.D.W. (pg)	20,91±0.91	20,31±0.28	20,41±0.84	20,71±0.56	22,41±0.11	22,16±1.20	21,21±0.84	21,21±0.28	---	---
V.C.M. (f)	49,1±0.31	49±0.42	49,45±1.62	49,6±0.56	46,3±0.47	46,65±1.90	47,0±1.13	47,6±0.41	46 – 60	50,0 – 59,0
H.C.M. (g/dL)	17,7±0.87	17,0±0.63	17,6±0.42	17,3±0.00	16,7±0.72	16,35±0.49	16,17±0.35	16,85±0.35	17,1 – 20,4	17,0 – 19,5
Leucócitos (mm ³)	5,3±1.29e	7,4±0.70c	7,9±0.21c	12,8±0.00a	8,4±1.22b	8,2±0.70b	8,5±0.70b	11,1±0.70a	---	---
Bastonetes (mm ³)	53±8.2d	74,5±12.02c	79,0±2.82c	128±4.24b	84±6.34c	120±25.45b	129±7.07b	275,5±14.84a	6,2 – 26,7	17,1 – 47,9
Eosinófilos (mm ³)	106,0±0.93a	83,0±0.45b	119,5±10.60a	65,5±8.22c	0±0.00d	0±0.00d	0±0.00d	57,5±0.86c	0,2 – 3,5	0,3 – 4,0
Linfócitos T (mm ³)	43,4±1.42c	61,1±1.41b	63,0±0.70b	95,8±0.70a	66,3±0.16b	70,0±0.00b	46,0±0.70c	63,±0.70b	66,6 – 90,3	48,7 – 78,1
Monócitos (mm ³)	1,0±2.73d	2,1±1.41b	1,5±5.65c	3,1,15±9.19a	1,6,0±3.87c	1,6,0±16.97c	1,7,0±4.24c	2,2,0±18.38b	0,8 – 3,8	1,0 – 6,5
Plaquetas	552±5.66	519±22.62	728±7.07	727±4.94	638±12.22	822±25.45	846±2.82	612±19.09	638 – 1177	837 – 1455

Valores expressos em média ± desvio padrão. R.D.W.: Red Cell Distribution Width (Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos), V.C.M.: Valor Corpuscular Médio, H.C.M.: Hemoglobina Corpuscular Média. *P: Padrão; PP: Padrão + Probiótico; H: Hipercalórica; HP: Hipercalórica + Probiótico; PD: Padrão + DMH; PPD: Padrão + Probiótico + DMH; HD: Hipercalórica + DMH; HPD: Hipercalórica + Probiótico + DMH. **REF 1: Centro de criação de animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (2004). ***REF 2: Melo et al (2012). ---: Valores não realizados. Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

5.3. Parâmetros Bioquímicos

As análises de determinação dos parâmetros bioquímicos estão expressas na Tabela 5. Os valores referentes à glicemia de jejum (3 horas) no presente estudo encontraram-se dentro dos valores de referência utilizados (Melo et al., 2012), não havendo diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos. Na literatura encontra-se relatos sobre o efeito anti-diabético dos micro-organismos probióticos (Bezerra, Carvalho e Viana, 2017). Em um estudo realizado por Yadav et al. (2006) constataram o potencial anti-diabético de dahi (iogurte caseiro produzido com leite indiano) suplementado com *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* NCDC 60 em ratos *Wistar*, porém, demonstram a necessidade de estudos mais aprofundados para identificar o mecanismo o qual justifica este potencial.

Em relação aos valores encontrados para colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos foi observada divergência nos valores de todos os grupos quando comparados às referências encontradas para ratos da linhagem *Wistar* (Melo et al., 2012). Porém, não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao controle ($p>0,05$), demonstrando que a bactéria não apresentou potencial de redução do perfil lipídico em comparação aos demais grupos analisados. Há poucos relatos sobre a eficácia de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* frente à níveis séricos de colesterol e triglicerídeos, no entanto, a literatura relata evidências promissoras sobre os efeitos hipocolesterolêmicos de bactérias probióticas em modelos animais e humanos. Kimoto et al. (2002) comprovaram que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* teve a capacidade de redução de colesterol *in vitro*, supondo-se efeito hipocolesterolêmico *in vivo*.

Por meio dos valores encontrados para TGO foi observado diferença significativa entre alguns grupos ($p<0,05$). O grupo Hipercalórica + Probiótico apresentou valores significativamente inferiores ao grupo Hipercalórica ($p<0,05$), constatando que diante da dieta hipercalórica, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* exerce efeito redutor nesta enzima. Da mesma forma, foi observada diferença significativa entre os grupos Hipercalórica + DMH e Hipercalórica demonstrando que o agente químico pode ter causado alteração na produção de enzimas devido ao seu potencial oxidativo.

Para os valores referentes de TGP, observou-se que todos os grupos apresentaram valores dentro do limite aceitável quando comparados à referência padrão de Melo et al. (2012). No entanto, de acordo com o teste estatístico, houve diferença significativa entre

alguns grupos ($p < 0,05$). No grupo Padrão + Probiótico foi observado valor significativamente maior quando comparado ao grupo Padrão. Este resultado demonstra que a bactéria probiótica causou liberação aumentada de enzimas na corrente sanguínea, não causando dano tecidual, visto que os valores destas não estão acima do valor de referência. Quando submetidos à dieta hipercalórica, o probiótico reduziu os níveis de TGP e essa redução pode ser consequência da oxidação lipídica causada nas células, reduzindo a produção de enzimas (Salminen & Paul, 2014). Da mesma maneira, o agente químico teve efeito semelhante na dieta Hipercalórica e o grupo Hipercalórica + DMH teve resultado significativamente menor quando comparado ao grupo Hipercalórica ($p < 0,05$).

Diante de circunstâncias normais, as enzimas TGO e TGP residem nas células do fígado, diante de alterações as células liberam estas enzimas para o fluxo sanguíneo. As transaminases catalisam reações químicas nas células nas quais um grupamento amino é transferido de uma molécula doadora a uma molécula recipiente. TGO e TGP são indicadores sensíveis de dano hepático, porém, a interpretação da alteração dos níveis é determinada pelo quadro clínico geral (Porto et al., 2011)

Quando analisados os níveis de creatinina sérico foi observado que somente os valores do grupo que recebeu dieta Hipercalórica estava de acordo com os limites aceitáveis, tendo como média valores significativamente maiores ($p > 0,05$) do que os demais grupos. Os demais grupos demonstraram níveis abaixo dos valores de referência (Melo et al., 2012), excluindo possível dano ao organismo animal. A concentração elevada de creatinina na corrente sanguínea é indicativo de existência de insuficiência renal, demonstrando que a filtração glomerular está comprometida (Thrall, 2007). O nível elevado de creatinina do grupo Hipercalórica comparado aos demais grupos, pode indicar, a longo prazo, um risco aumentado para insuficiência renal.

Tabela 5. Determinação dos parâmetros bioquímicos realizados em todos os animais do experimento.

Parâmetros (unid.)	P*	PP	PD	PPD	H	HD	HPD	HP
----- média ± desvio padrão -----								
Glicemia (mg/dL)	126,87±9.31	126,87±30.22	140,83±36.92	110,50±15.53	141,03±32.37	142,51±24.61	123,02±21.79	137,40±26.96
Col. Total (mg/dL)	172,89±14.71	150,74±10.06	180,45±32.23	140,71±33.69	180,45±34.83	179,54±25.60	141,36±10.01	140,71±4.24
Col. HDL (mg/dL)	99,87±10.84 b	85,18±17.02 c	102,98±17.78 b	127,70±29.59 a	87,22±9.71 c	101,33±13.21 b	106,42±25.22 b	71,27±10.94 d
TG (mg/dL)	193,13±24.17 c	176,67±31.13 c	246,34±28.81 b	220,90±32.80 b	312,52±32.94 a	218,49±23.93 b	153,50±29.52 c	227,01±35.12 b
TGO (U/L)	58,81±3.15 b	59,54±4.88 b	69,07±4.33 a	59,72±6.81 b	67,60±5.38 a	50,00±3.66 c	49,38±1.87 c	56,26±4.66 b
TGP (U/L)	49,70±0.87 b	54,72±1.93 a	50,68±0.39 b	48,73±1.88 c	52,68±3.44 a	46,02±0.24 d	48,64±2.18 c	48,51±1.24 c
Creatinina (mg/dL)	0,10±0.06 b	0,06±0.04 b	0,05±0.03 b	0,04±0.03 b	0,60±0.16 a	0,04±0.01 b	0,01±0.01 b	0,05±0.01 b

Valores expressos em média ± desvio padrão. Col. Total: colesterol total, Col. HDL: colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade), TG: triglicerídeos, TGO: transaminase glutâmico-oxalacética, TGP: transaminase glutâmico-pirúvica. *P: Padrão; PP: Padrão + Probiótico; H: Hipercalórica; HP: Hipercalórica + Probiótico; PD: Padrão + DMH; PPD: Padrão + Probiótico + DMH; HD: Hipercalórica + DMH; HPD: Hipercalórica + Probiótico + DMH. Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

Os valores de referência para parâmetros bioquímicos e hematológicos têm norteado as pesquisas experimentais na busca de fornecer informações que subsidiem a relação entre os resultados obtidos em animais saudáveis, com patologias e tratados, assim podendo discutir os resultados obtidos e confirmar a eficácia ou não de determinada terapia ou intervenção clínica. Por essa razão, o conhecimento dos valores dos diferentes parâmetros é critério importante para a avaliação da homeostase, das modificações induzidas por processos patológicos e dos resultados obtidos nos procedimentos experimentais (Lima et al., 2014).

5.4. Avaliação do Estado Redox e Estresse Oxidativo

Os resultados das análises referentes à avaliação do estresse oxidativo por meio do sistema de defesa enzimático de SOD e CAT e do estado redox pelo método de TBARS estão demonstrados na Figura 8.

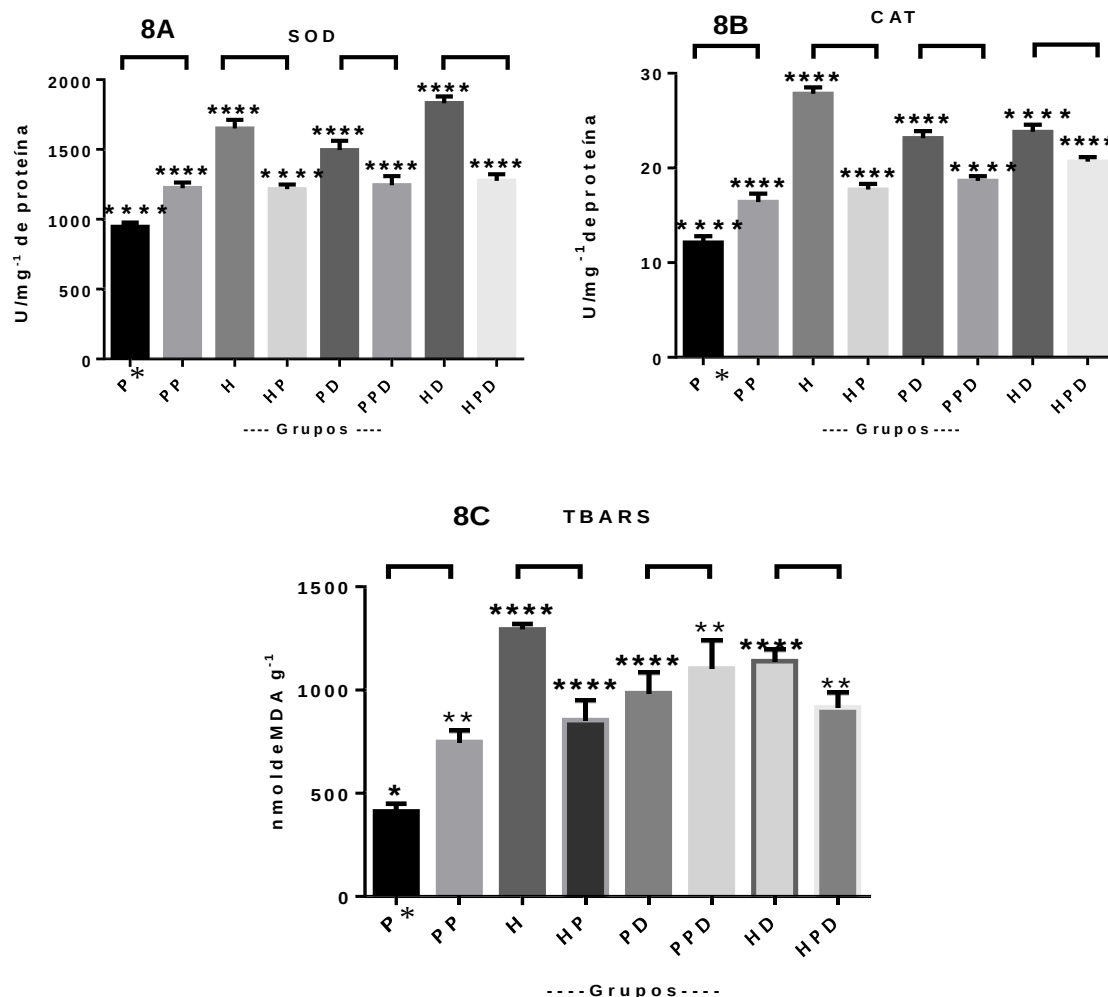
Pode-se observar que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* evidenciaram efeito significativo ($p < 0,05$) na atividade da SOD (Figura 8A) no grupo tratado com dieta Padrão + Probiótico quando comparado ao grupo Padrão. Da mesma forma, o mesmo resultado foi observado na análise da atividade da CAT (Figura 8B) em que a bactéria probiótica apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade desta enzima no grupo Padrão + Probiótico. Diferentemente, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* demonstrou uma expressiva redução na atividade da SOD e CAT nos demais grupos que receberam a bactéria probiótica (Hipercalórica + Probiótico; Padrão + Probiótico + DMH, e Hipercalórica + Padrão + DMH), demonstrando, desta forma, que o probiótico não apresentou efeito sobre a atividade destas enzimas quando na presença de dieta rica em gordura e indutor químico.

O estresse oxidativo pode estar relacionado a condições fisiológicas ou patológicas, como o envelhecimento (Nasri & Rafieian-Kopaei, 2013), doença cardíaca (Karabacak et al., 2014), diabetes (Karunakaran & Park, 2013; Maritim et al., 2003), disfunção cerebral (Salminen & Paul, 2014), câncer (Kodydkova et al., 2013) e outros problemas de saúde (Mayne, 2013). A atividade das enzimas antioxidantes neutralizam os radicais livres, prevenindo o estresse oxidativo. Outros estudos (Ejtahed et al., 2012; Amaretti et al., 2013; Abdhul et al., 2014;) indicaram que algumas cepas probióticas exercem atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* e podem ser eficazes na redução do estresse oxidativo causado por condições específicas. Kumar et al. (2012) 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 glutathione S-transferase (GST) em comparação ao controle. Em modelos experimentais induzidos ao câncer de cólon com DMH, a exposição do organismo aos radicais livres é elevada, já que DMH eleva a produção destes compostos (Sengottuvelan et al., 2006).

Na Figura 8C observa-se que a suplementação dos animais com a bactéria probiótica quando submetidos a dieta Padrão + Probiótico demonstrou efeito significativo pró-oxidante em relação ao grupo Padrão sobre a inibição da peroxidação lipídica hepática ($p < 0,05$). Inversamente, quando administrada dieta Hipercalórica + Probiótico, observou-se efeito protetor na peroxidação lipídica quando comparado ao grupo Hipercalórica ($p < 0,05$). Da mesma forma, foi observada inibição da peroxidação lipídica no tecido hepático dos animais no grupo Hipercalórica + Probiótico + DMH, no qual foi observada maior atividade antioxidante quando comparado ao grupo Hipercalórica + DMH ($p < 0,05$).

De acordo com a literatura, a suplementação com probióticos vêm sendo amplamente investigada, uma vez que estes podem apresentar funções importantes em condições de estresse oxidativo e inflamatórias causadas pelo alto consumo de gordura, a partir da redução da produção de mediadores inflamatórios por atuarem em vias de sinalização celular e serem capazes de alterar o padrão de expressão de determinados genes (Latvala et al., 2011). O estresse oxidativo ocasiona uma alteração dos lipídios conhecida como peroxidação lipídica, além de danos oxidativos no DNA e proteínas (grupos carbonilas e sulfidrilas) (Silva & Ferrari, 2011). Por sua vez, o DMH é metabolizado principalmente no fígado, e em alguma extensão do cólon, sendo que o metabólito final leva à formação de radicais livres e peróxido de hidrogênio provocando estresse oxidativo devido ao desequilíbrio de espécies reativas ao oxigênio e antioxidantes endógenos (Khan & Sultana, 2011). Alguns estudos têm demonstrado que a atividade anticarcinogênica dos probióticos se deve, em parte, a atividade antioxidante dos mesmos (Kumar et al., 2012; Mohania et al., 2013). Sendo assim, um sistema antioxidante eficaz é essencial para o combate ao desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas. Essas alterações na atividade das enzimas do sistema antioxidante podem ser resultantes de uma adaptação decorrente do estresse oxidativo aumentado ou diminuído naquele órgão frente à uma dieta hipercalórica. Além disso, outras vias antioxidantes podem terem sido utilizadas diferentes da enzimática para eliminar os radicais livres (Castex et al., 2010).



Figuras 8. Estresse oxidativo e estado redox. Avaliação do estresse oxidativo, avaliado por enzimas SOD (A) e CAT (B) e estado redox pelo método TBARS (C). Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. *P: Padrão; PP: Padrão + Probiótico; H: Hipercalórica; HP: Hipercalórica + Probiótico; PD: Padrão + DMH; PPD: Padrão + Probiótico + DMH; HD: Hipercalórica + DMH; HPD: Hipercalórica + Probiótico + DMH. *: $p<0,05$. **: $p<0,005$. ***: $p<0,005$. ****: $p<0,00005$.

5.5. Análise Histológica do Tecido Intestinal

Após o procedimento da eutanásia e incisão do tecido intestinal, foi realizada a análise histológica do tecido dos 54 animais, sendo os tumores classificados de acordo com os graus das atipias das criptas do cólon.

Conforme demonstrado na Tabela 6, evidenciou-se a integridade das células intestinais nos animais dos grupos não submetidos à indução com DMH, sendo classificadas como livres de alterações (Padrão; Padrão + Probiótico; Hipercalórica; Hipercalórica +

Probiótico). Nos demais grupos, foram encontradas alterações referentes a pólipos grau I, atipia benigna das criptas, atipias suspeitas e/ou atipias malignas em classificações de graus I, II, III e IV.

No grupo que recebeu dieta padrão + DMH foram encontradas alterações de atipias suspeitas e atipias malignas de grau I, II e III. Quando administrada a suspensão da bactéria probiótica no grupo submetido a dieta padrão + DMH a malignidade não foi observada, sendo que as lesões dos animais deste grupo foram classificadas como atipias benignas das criptas em graus 0, I e II e, atipias suspeitas em grau I, no entanto, em um dos animais foi observado grande infiltrado de linfócitos.

No grupo que recebeu dieta hipercalórica + DMH (HD) observou-se animais com lesões classificadas como atipia benigna das criptas grau I, atipias suspeitas graus I e II e, atipias malignas graus I, II e III. Novamente, quando a bactéria probiótica foi administrada no grupo tratamento (Hipercalórica + Probiótico + DMH), a maioria dos animais tiveram suas lesões classificadas como atipias benignas das criptas, sendo que em um animal do grupo foi observada atipia maligna grau II, e também foi observado grande infiltrado de linfócitos, o que demonstra o potencial do probiótico na melhoria da resposta imune no hospedeiro (Figuras 9, 10, 11, 12, 13).

Este resultado evidencia que os grupos que receberam a bactéria probiótica *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, desenvolveram alterações de menor grau quanto à sua agressividade quando comparadas aos grupos que não receberam a bactéria em concomitância, o que demonstra que o consumo desta bactéria probiótica tem efeito positivo quando administrada à pacientes com desenvolvimento de células carcinogênicas no epitélio colorretal, estabilizando a evolução dos graus de atipia.

Até o momento, não se tem conhecimento sobre o potencial anticarcinogênico *in vivo* de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. McIntosh et al. (2009) demonstraram o efeito positivo de uma estirpe probiótica de *Lactobacillus acidophilus* administrada por quatro semanas em ratos Sprague-Dawley na redução de tumores intestinais induzidos com DMH (20 mg/kg em aplicações semanais por quatro semanas). Lenoir et al. (2016) constataram o alto potencial de *Lactobacillus casei* BL23 para tratar CCR em camundongos C57BL/6 por meio da modulação de respostas imunes do hospedeiro as quais protegeram significativamente os camundongos contra CCR induzido por DMH (20 mg/kg durante 10 semanas).

Os mecanismos por quais os probióticos tendem a inibir o desenvolvimento do câncer de cólon ainda são desconhecidos. Entretanto, sugerem-se alguns mecanismos de atuação incluindo a ligação e degradação de compostos carcinogênicos, estimulação da resposta imune, produção de compostos antitumorígenos e antimutagênicos no cólon e alteração da atividade metabólica da microbiota intestinal (McIntosh, 2009). Gomes e Malcata (1999) evidenciaram que situações clínicas juntamente com a carcinogênese intestinal podem ser mediadas por enzimas fecais, as quais transformam compostos pró-carcinogênicos em compostos carcinogênicos. Os autores mencionam ainda ensaios clínicos realizados em modelos biológicos que demonstraram que algumas estirpes de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* possuem a capacidade de reduzir os níveis de tais enzimas, reduzindo o risco de desenvolvimento de tumores.

Sugere-se no presente estudo que, a bactéria de origem láctea *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tem potencial anticarcinogênico *in vivo*, estabilizando o desenvolvimento tumoral de células no epitélio colorretal, tornando este resultado promissor para a ciência nas pesquisas relacionadas à administração de bactérias probióticas na atenção primária ao câncer colorretal.

Tabela 6. Classificação das lesões diagnosticadas no epitélio colônico através de análise histológica.

Identificação (grupo e animal)	Classificação (grau)	Atipia Benigna das Criptas	Atipia Inconclusiva	Atipias Suspeitas	Atipias Malignas	Livre de Alterações	Outras
P* 1	0					X	
P 2	0					X	
P 3	0					X	
P 4	0					X	
P 5	0					X	
PP 1	0					X	
PP 2	0					X	
PP 3	0					X	
PP 4	0					X	
PP 5	0					X	
PP 6	0					X	
H 1	0					X	
H 2	0					X	
H 3	0					X	
H 4	0					X	
H 5	0					X	
HP 1	0					X	
HP 2	0					X	
HP 3	0					X	
HP 4	0					X	
HP 5	0					X	
HP 6	0					X	
HP 7	0					X	

Identificação (grupo e animal)	Classificação (grau)	Atipia Benigna das Criptas	Atipia Inconclusiva	Atipias Suspeitas	Atipias Malignas	Livre de Alterações	Outras
PD 1	I			X	X		
PD 2	I			X	X		
PD 3	II				XX		
PD 4	III				XXX		
PD 5	IV				XXXX		
PD 6	II				XX		
PD 7							
PPD 1	I	X		X			Pólipo
PPD 2	I	X		X			
PPD 3	0	X					
PPD 4	II	XX					
PPD 5	II	XX					
PPD 6	I	X					
PPD 7	I	X					Grande infiltrado de linfócitos
HD 1	I	X					Pólipo
HD 2	I			X	X		
HD 3	II			X	XX		
HD 4	I			X			Pólipo
HD 5	II				XX		
HD 6	III				XXX		
HD 7	I				X		
HD 8	II				XX		

Identificação (grupo e animal)	Classificação (grau)	Atipia Benigna das Criptas	Atipia Inconclusiva	Atipias Suspeitas	Atipias Malignas	Livre de Alterações	Outras
HPD 1	I				X		
HPD 2	I	X					
HPD 3	I	X					
HPD 4	I	X					
HPD 5	I	X		X			
HPD 6	I	X		X			
HPD 7	II				XX		Grande infiltrado de linfócitos

*P: Padrão; PP: Padrão + Probiótico; H: Hipercalórica; HP: Hipercalórica + Probiótico; PD: Padrão + DMH; PPD: Padrão + Probiótico + DMH; HD: Hipercalórica + DMH; HPD: Hipercalórica + Probiótico + DMH.

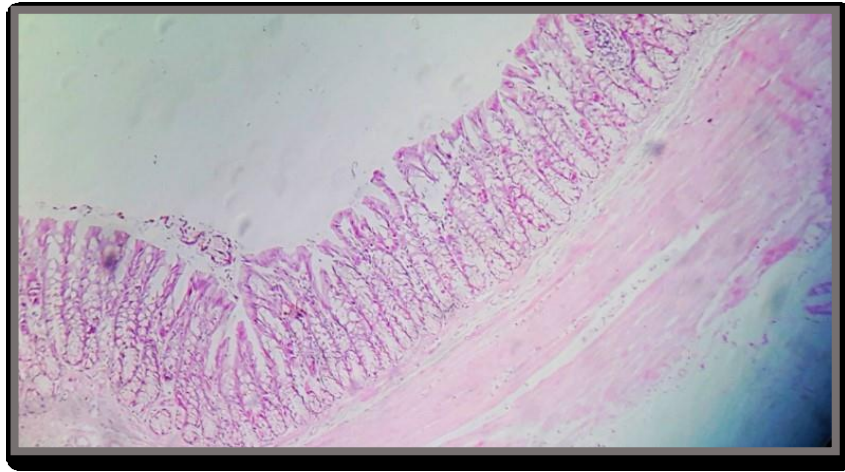


Figura 9. Tecido intestinal sem alterações. Aumento de 5 x.



Figura 10. Tecido intestinal com alteração de atipia grau I. As setas indicam alterações. Aumento de 5 x.

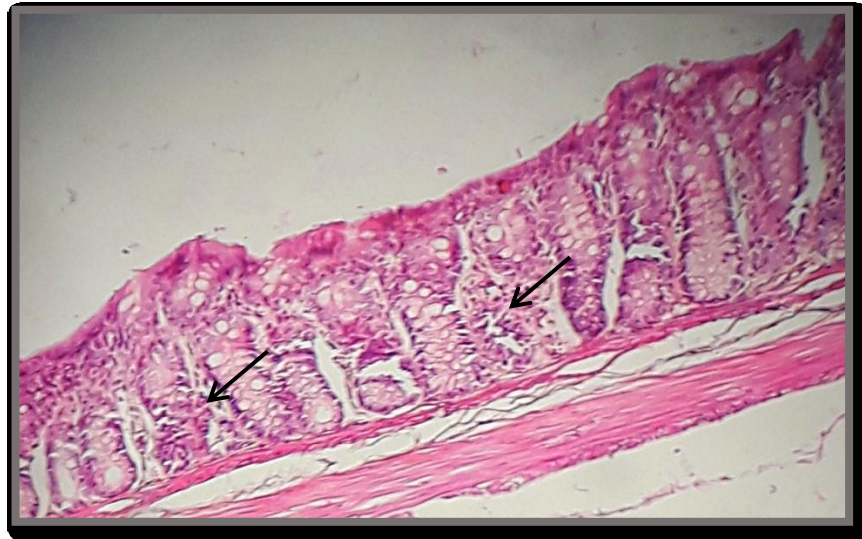


Figura 11. Tecido intestinal com alteração de atipia grau II. As setas indicam alterações. Aumento de 10 x.

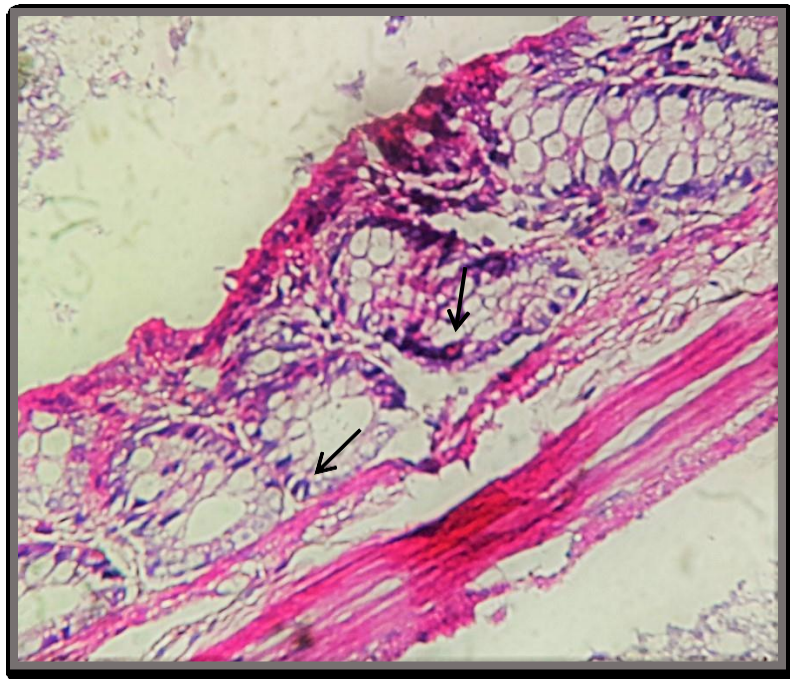


Figura 12. Tecido intestinal com alteração de atipia grau III. As setas indicam alterações. Aumento de 40 x.

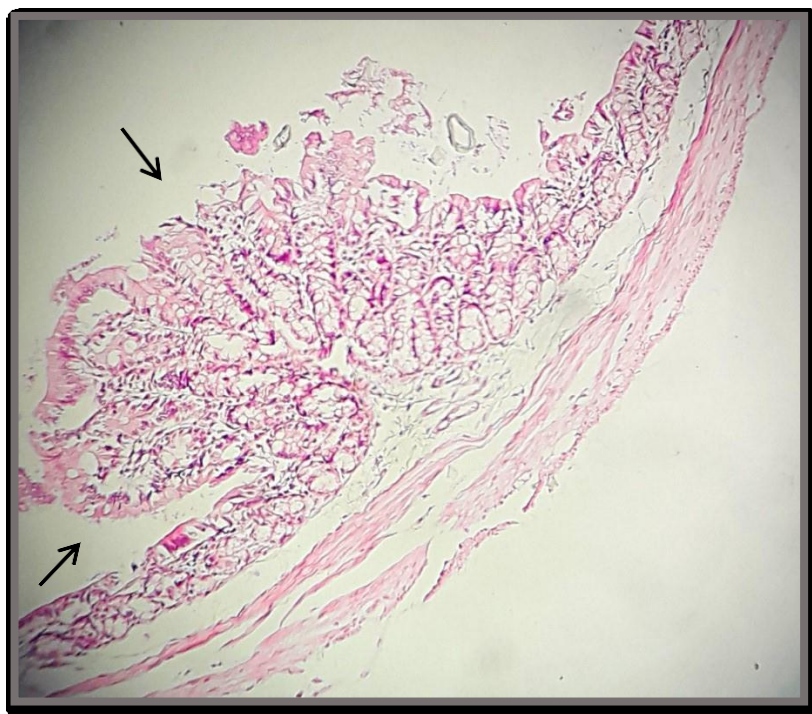


Figura 13. Tecido intestinal com alteração por pólipio grau I. As setas indicam o pólipio. Aumento de 10 x.

6. Conclusão

Lactococcus lactis subsp. *lactis* *in vivo* apresentou potencial anticarcinogênico em CCR quando induzido em modelos animais. Além disso, a bactéria teve a capacidade de estabilizar o ganho de peso e reduzir adiposidade abdominal, tais fatos propiciam o desenvolvimento de síndromes metabólicas. Nos parâmetros hematológicos, observou-se ligeira resposta imune do probiótico frente a condições adversas. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* apresentou ainda, potencial antioxidante diante de situações de estresse oxidativo quando administrada na dieta padrão e efeito sobre a inibição da peroxidação lipídica quando administrada dieta hipercalórica e indução carcinogênica química. Estes resultados são promissores, pois demonstram o potencial do probiótico na estabilização do câncer colorretal.

7. Referências

- ABDHUL, K.; GANESH, M.; SHANMUGHAPRIYA, S.; KANAGAVEL, M.; ANBARASU, K. NATARAJASEENIVASAN, K. Antioxidant activity of exopolysaccharide from probiotic strain *Enterococcus faecium* (BDU7) from Ngari. **International journal of biological macromolecules**, v. 70, p. 450-454, 2014.
- ABODERIN, F. I.; OYETAYO, V. O. Haematological studies of rats fed different doses of probiotic, *Lactobacillus plantarum*, isolated from fermenting corn slurry. **Pak. J. Nutr**, v. 5, n. 2, p. 102-105, 2006.
- AEBI, H. Catalase in vitro. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1984. p. 121-126.
- ALVAREZ-OLMOS, M. I.; OBERHELMAN, R. A. Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. **Clinical infectious diseases**, v. 32, n. 11, p. 1567-1576, 2001.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), mercosul/GMC/Res.Nº79/1994 (a). Disponível em URL:<<http://w.w.w.anvisa.gov.br>>. Acessado 19 de março de 2018
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), mercosul/GMC/Res.Nº82/1996 (b). Disponível em URL:<<http://w.w.w.anvisa.gov.br>>. Acessado 19 de março de 2018
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), mercosul/GMC/Res.Nº134/1996 (c). Disponível em URL:<<http://w.w.w.anvisa.gov.br>>. Acessado 19 de março de 2018
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Rotulagem nutricional obrigatória: manual de orientação às indústrias de Alimentos - 2º Versão – Universidade de Brasília – Brasília : Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária / Universidade de Brasília. 44p. 2005.

- AMARETTI, A.; DI NUNZIO, M.; POMPEI, A.; RAIMONDI, S.; ROSSI, M.; BORDONI, A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 809-817, 2013.
- AMBALAM, P.; RAMAN, M.; PURAMA, R. K.; DOBLE, M. Probiotics, prebiotics and colorectal cancer prevention. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 30, n. 1, p. 119-131, 2016.
- AVERY, G. S.; VERNON, M. P.; CROCKETT, W. M.; MCLEAN, L. D. **Cleaning fluid comprising glycerin and a culture of microorganisms**. U.S. Patent n. 8,951,953, 10 fev. 2015.
- BAENA, R.; SALINAS, P. Diet and colorectal cancer. **Maturitas**, v. 80, n. 3, p. 258-264, 2015.
- BEDANI, R.; ROSSI, E. A. Microbiota intestinal e probióticos: implicações sobre o câncer de cólon. **Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 16, n. 1, p. 19-28, 2009.
- BERTKOVA, I.; HIJOVA, E.; CHMELAROVA, A.; MOJZISOVA, G.; PETRASOVA, D.; STROJNY, L.; BOMBA, A.; ZITNAN, R. The effect of probiotic microorganisms and bioactive compounds on chemically induced carcinogenesis in rats. **Neoplasma**, v. 57, n. 5, p. 422, 2010.
- BEZERRA, A.; CARVALHO, N.; VIANA, C.; CAROLINA, A.; MORAIS, S. Efeito da suplementação de probióticos no diabetes mellitus: uma revisão sistemática. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE)**, v. 15, n. 2, 2017.
- BULTMAN, S. J. The microbiome and its potential as a cancer preventive intervention. In: **Seminars in oncology**. Elsevier, 2016. p. 97-106.
- CALAÇA, P. R.; BEZERRA, R. P.; PORTO, A. L.; CAVALCANTI, M. T. Probiotics as a preventive strategy for surgical infection in colorectal cancer patients: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. **Translational gastroenterology and hepatology**, v. 2, 2017.

CAPELOZZI, V. L. Role of immunohistochemistry in the diagnosis of lung cancer. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 4, p. 375-382, 2009.

CASTEX, M. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. **Fish & shellfish immunology**, v. 28, n. 4, p. 622-631, 2010.

CAVANAGH, D.; FITZGERALD, G. F.; MCAULIFFE, O. From field to fermentation: the origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. **Food microbiology**, v. 47, p. 45-61, 2015.

CELIK, C.; MITTELMAN, A.; PAOLINI Jr., N.S.; LEWIS, D.; EVANS, J.T. Effects of 1, 2-symmetrical dimethylhydrazine on jejunocolic transposition in Sprague-Dawley rats. **Cancer research**, v. 41, n. 7, p. 2908-2911, 1981.

CHONG, E. S. L. A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 351-374, 2014.

COBEA. Princípios éticos na experimentação animal. [Acesso 2017 dez 29]. Disponível em: <http://www.cobea.org.br>, 2004.

COSENTINO, S.; FADDA, M. E.; DEPLANO, M.; MELIS, R.; POMATA, R.; PISANO, M. B. Antilisterial activity of nisin-like bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from traditional Sardinian dairy products. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012.

CROCE, C. M. Oncogenes and cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 5, p. 502-511, 2008.

DE ANDRADE FERREIRA, M.; FILHO, S. D. C. V.; MUNIZ, E. B.; VERAS, A. S. C. Características das carcaças, biometria do trato gastrointestinal, tamanho dos órgãos internos e conteúdo gastrointestinal de bovinos F1 Simental x Nelore alimentados com dietas contendo vários níveis de concentrado. **Rev. bras. zootec**, v. 29, n. 4, p. 1174-1182, 2000.

- DENIPOTE, F. G.; TRINDADE, E. B. S. D. M.; BURINI, R. C. Probiotics and prebiotics in primary care for colon cancer. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 47, n. 1, p. 93-98, 2010.
- DEVKOTA, S.; WANG, Y.; MUSCH, M. W.; LEONE, V.; FEHLNER-PEACH, H.; NADIMPALLI, A.; ANTONOPOULOS, A. D.; JABRI, B.; CHANG, E. B. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in Il10^{-/-} mice. **Nature**, v. 487, n. 7405, p. 104, 2012.
- EJTAHED, H. S.; MOHTADI-NIA, J.; HOMAYOUNI-RAD, A.; NIAFAR, M.; ASGHARI-JAFARABADI, M.; MOFID, V. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. **Nutrition**, v. 28, n. 5, p. 539-543, 2012.
- EL-KHADRAGY, M. F.; NABIL, H. M.; HASSAN, B. N.; TOHAMY, A. A.; WAAER, H. F.; YEHA, H. M.; MONEIM, A. E. A. Bone Marrow Cell Therapy on 1, 2-Dimethylhydrazine (DMH)-Induced Colon Cancer in Rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 3, p. 1072-1083, 2018.
- FERLAY, J.; SHIN, H. R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International journal of cancer**, v. 127, n. 12, p. 2893-2917, 2010.
- FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, v. 136, n. 5, 2015.
- FIALA, E. S. Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogens 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane. **Cancer**, v. 40, p. 2436 –2445, 1977
- FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. Salvador, 2004.
- GILL, H. S.; CROSS, M. L. 13 Probiotics and Immune Function. **Nutrition and immune function**, p. 251, 2002.

GLICK, P.L.; LORIMIER, A.A.; ADZICK, N.S.; HARRISON, M.R. Colon interposition: an adjuvant operation for short-gut syndrome. **Journal of pediatric surgery**, v. 19, n. 6, p. 719-725, 1984.

GOEL, H.; TIKOO, K.; ARUN KARPE, P.; SINGLA, R.; RANJAN SINHA, V. Ameliorated Chemotherapeutic Potential of Diverse Dose Flouropyrimidine Therapy By Etodolac via NF-KB Pathway, PPAR- γ Expression and COX-II Inhibition in DMH Induced Colon Cancer Rats. **Clinical Cancer Drugs**, v. 3, n. 2, p. 109-120, 2016.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Bol. Biotecnol. AI**, v. 64, p. 12-22, 1999.

GONZÁLEZ REVELLO, Á.; CARRO, S.; CAL, K.; GIACAMAN, S.; ALDROVANDI, A. *Lactococcus lactis* autóctono: evaluación del efecto antilisterial y de propiedades sensoriales en quesos tipo Cuartirolo. **Innotec**, n. 12, 2016.

GRAHN, E.; HOLM, S.E.; LILJA, H.; SELLGREN, K. Interference of a *Lactococcus lactis* strain on the human gut flora and its capacity to pass the stomach and intestine. **Scandinavian Journal of Nutrition**, v. 38, p. 2-4, 1994.

GRUZZA, M.; DUVAL-IFLAH, Y.; DUCLUZEAU, R. Colonization of the digestive tract of germ-free mice by genetically engineered strains of *Lactococcus lactis*: study of recombinant DNA stability. **Microbial releases: viruses, bacteria, fungi**, v. 1, n. 3, p. 165-171, 1992.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Fisiologia feminina antes da gravidez e os hormônios femininos. **Tratado de fisiologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, p. 869-82, 2002.

HAGHSHENAS, B., ABDULLAH, N., NAMI, Y., RADIAH, D., ROSLI, R., KHOSROUSHAHI, A.Y. Different effects of two newly-isolated probiotic *Lactobacillus plantarum* 15HN and *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* 44Lac strains from traditional dairy products on cancer cell lines. **Anaerobe**, v. 30, p. 51-59, 2014.

HAMILL, F. A. Cancer-related fatigue syndrome. **Integrative Cancer Therapies**, Thousand Oaks, v. 1, p. 423-424, 2002.

HOFFMAN-GOETZ, L. A. U. R. I. E. Physical activity and cancer prevention: animal-tumor models. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 35, n. 11, p. 1828-1833, 2003.

INAMORI, Y.; MISUMI, A.; MURAKAMI, A.; AKAGI, M. The histogenesis of dmh induced colonic carcinoma in rats. **Gastroenterologia Japonica**, v. 22, n. 1, p. 7-17, 1987.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa 2018. Disponível em URL: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>>. Acessado em 01 de março de 2018.

JUNQUEIRA, L. C.;CARNEIRO, J. Tecido epithelial._**Histologia Básica**, v. 10, p. 47-68, 2008.

KADOOKA, Y.; SATO, M.; IMAIZUMI, K.; OGAWA, A.; IKUYAMA, K.; AKAI, Y.;TSUCHIDA, T. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. **European journal of clinical nutrition**, v. 64, n. 6, p. 636, 2010.

KHAN, R.; SULTANA, S. Farnesol attenuates 1, 2-dimethylhydrazine induced oxidative stress, inflammation and apoptotic responses in the colon of Wistar rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 192, n. 3, p. 193-200, 2011.

KARABACAK, N. M.; SPUHLER, P. S.; FACHIN, F.; LIM, E. J.; PAI, V.; OZKUMUR, E.; YANG, J. Microfluidic, marker-free isolation of circulating tumor cells from blood samples. **Nature protocols**, v. 9, n. 3, p. 694, 2014.

KARUNAKARAN, U.; PARK, K. G. A systematic review of oxidative stress and safety of antioxidants in diabetes: focus on islets and their defense. **Diabetes & metabolism journal**, v. 37, n. 2, p. 106-112, 2013.

KIMOTO, H.; KURISAKI, J.; TSUJI, N. M.; OHMOMO, S.; OKAMOTO, T. *Lactococci* as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 5, p. 313-316, 1999.

KIMOTO, H.; OHMOMO, S.; OKAMOTO, T. Cholesterol removal from media by lactococci. **Journal of dairy science**, v. 85, n. 12, p. 3182-3188, 2002.

KIMOTO, H.; NOMURA, M.; KOBAYASHI, M.; MIZUMACHI, K.; OKAMOTO, T. Survival of lactococci during passage through mouse digestive tract. **Canadian journal of microbiology**, v. 49, n. 11, p. 707-711, 2003.

KIMOTO, H.; NOMURA, M.; KOBAYASHI, M.; OKAMOTO, T. OHMOMO, S. Identification and probiotic characteristics of *Lactococcus* strains from plant materials. **Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ**, v. 38, n. 2, p. 111-117, 2004.

KLAMT, F.; DAL-PIZZOL, F.; DA FROTA JR, M. L. C.; WALZ, R.; ANDRADES, M. E.; DA SILVA, E. G.; MOREIRA, J. C. F. Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, n. 10, p. 1137-1144, 2001.

KLIJN, N.; WEERKAMP, A.H; AND DE VOS, W.M. Genetic marking of *Lactococcus lactis* shows its survival in the human gastrointestinal tract. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 7, p. 2771-2774, 1995

KODYDKOVA, J.; VAVROVA, L.; STANKOVA, B.; MACASEK, J.; KRECHLER, T.; ZAK, A. Antioxidant status and oxidative stress markers in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. **Pancreas**, v. 42, n. 4, p. 614-621, 2013.

KUMAR, R. S.; KANMANI, P.; YUVARAJ, N.; PAARI, K. A.; PATTUKUMAR, V.; THIRUNAVUKKARASU, C; ARUL, V. Satish et al. *Lactobacillus plantarum* AS1 isolated from south Indian fermented food Kallappam suppress 1, 2-dimethyl hydrazine (DMH)-induced colorectal cancer in male Wistar rats. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 166, n. 3, p. 620-631, 2012.

LAQUEUR, G. L. (1965). The induction of intestinal neoplasms in rats with the glycoside cycin and its aglycone. **Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin**, v. 340, n. 2, p. 151-163, 1965.

LARANGEIRA, L. L. S.; TAHA, M. O.; FERME, A.; LEMOS, R.; PLAPLER, H. Localização de lesões tumorais induzidas pela 1, 2-dimetilhidrazina e seu grau de atipia no cólon de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 13, n. 3, 1998.

LATVALA, S.; MIETTINEN, M.; KEKKONEN, R. A.; KORPELA, R.; JULKUNEN, I. *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Streptococcus thermophilus* induce suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) gene expression directly and indirectly via interleukin-10 in human primary macrophages. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 165, n. 1, p. 94-103, 2011.

LEHTO, E. M.; SALMINEN, S. Adhesion of two *Lactobacillus* strains, one *Lactococcus* and one *Propionibacterium* strain to cultured human intestinal Caco-2 cell line. **Bioscience and Microflora**, v. 16, n. 1, p. 13-17, 1997.

LENOIR, M.; del CARMEN, S.; CORTES-PEREZ, N. G. *Lactobacillus casei* BL23 regulates Treg and Th17 T-cell populations and reduces DMH-associated colorectal cancer. **Journal of gastroenterology**, v. 51, n. 9, p. 862-873, 2016.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 2, p. 67-78, 2004.

LIU, X.; CHUNG, Y. K.; YANG, S. T.; YOUSEF, A. E. Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 13-24, 2005.

LORENZI, T. F. Manual de hematologia: propedêutica e clínica. In: **Manual de hematologia: propedêutica e clínica**. 2003.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MANJU, V.; NALINI, N. Protective role of luteolin in 1, 2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. **Cell biochemistry and function**, v. 25, n. 2, p. 189-194, 2007.

MARITIM, A. C.; SANDERS, A.; WATKINS, J. 3. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 17, n. 1, p. 24-38, 2003.

MAYNE, S. T. Oxidative stress, dietary antioxidant supplements, and health: is the glass half full or half empty?. 2013.

McGARRITY, T. J.; PEIFFER, L. P.; COLONY, P. C. Cellular proliferation in proximal and distal rat colon during 1, 2-dimethylhydrazine-induced carcinogenesis. **Gastroenterology**, v. 95, n. 2, p. 343-348, 1988.

MCINTOSH, G. H.; ROYLE, P. J.; PLAYNE, M. J. A probiotic strain of *L. acidophilus* reduces DMH-induced large intestinal tumors in male Sprague-Dawley rats. **Nutrition and cancer**, v. 35, n. 2, p. 153-159, 1999.

MELO, M. G. D.; DÓRIA, G. A. A.; SERAFINI, M. R.; ARAÚJO, A. A. S. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, 2014.

MOHANIA, D. 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.

NAGENGAST, F. M.; GRUBBEN, M. J. A. L.; VAN MUNSTER, I. P. Role of bile acids in colorectal carcinogenesis. **European Journal of Cancer**, v. 31, n. 7-8, p. 1067-1070, 1995.

NALINI, N., MANJU, V., MENON, V. P. Effect of spices on lipid metabolism in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Journal of medicinal food*, 9(2), 237-245, 2006.

NASRI, H.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Tubular kidney protection by antioxidants. **Iranian journal of public health**, v. 42, n. 10, p. 1194, 2013.

NEVES, F. J. D.; MATTOS, I. E.; KOIFMAN, R. J. Mortalidade por câncer de cólon e reto nas capitais brasileiras no período 1980-1997. **Arq Gastroenterol**, p. 63-70, 2005.

NGONGANG, E. F. T.; TIENCHEU, B.; ACHIDI, A. U.; FOSSI, B. T.; SHIYNYUY, D. M.; WOMENI, H. M.; FRANÇOIS, Z. N. Effects of probiotic bacteria from yogurt on enzyme and serum cholesterol levels of experimentally induced hyperlipidemic Wistar Albino rats. **Am. J. Biol. Life Sci**, v. 4, p. 48, 2016.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OHNO, K.; NARUSHIMA, S.; TAKEUCHI, S.; ITOH, K.; ITOH, T.; HIOKI, K.; NOMURA, T. Effect of bacterial metabolism in the intestine on colorectal tumors induced by 1, 2-dimethylhydrazine in transgenic mice harboring human prototype c-Ha-ras genes. **Journal of experimental & clinical cancer research: CR**, v. 20, n. 1, p. 51-56, 2001.

OLIVEIRA, F. E. D. Tese de Doutorado (Biopatologia Bucal – UNESP). **Efeitos imunomoduladores e atividade anti-Candida de lactobacilos com propriedades probióticas em macrófagos e em modelo invertebrado de Galleria mellonella**. 2017.

O'KEEFE, S. J. D; OU, J.; AUFREITER, S.; O'CONNOR, D.; SHARMA, S.; SEPULVEDA, J.; MAWHINNEY, T. Products of the colonic microbiota mediate the effects of diet on colon cancer risk. **The Journal of nutrition**, v. 139, n. 11, p. 2044-2048, 2009.

ORLANDO, A.; LINSALATA, M.; RUSSO, F. Antiproliferative effects on colon adenocarcinoma cells induced by co-administration of vitamin K1 and Lactobacillus rhamnosus GG. **International journal of oncology**, v. 48, n. 6, p. 2629-2638, 2016.

OUWEHAND, A. C.; KIRJAVAINEN, P. V.; SHORTT, C.; SALMINEN, S. Probiotics: mechanisms and established effects. **International dairy journal**, v. 9, n. 1, p. 43-52, 1999.

PITOT, H. C. Animal models of neoplastic development. **Developments in biologicals**, v. 106, p. 53-7; discussion 57-9, 143-60, 2001.

PORTO, A. N; SEMENOFF, T. D. V; PEDRO, F. L. M; BORGES, A. H; LIMA, C; SEGUNDO, A. S. Avaliação da função hepática de ratas da linhagem Lewis frente a ingestão de álcool associada a periodontite induzida por ligadura. **Brazilian Journal Periodontol-December**. n 1, p.76- 79, 2011.

POTTER, J. D. Colorectal cancer: molecules and populations. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 11, p. 916-932, 1999.

RALLU, F.; GRUSS, A.; EHRLICH, S. D; MAGNIN, E. Acid-and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis*: identification of intracellular stress signals. **Molecular microbiology**, v. 35, n. 3, p. 517-528, 2000.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K Farmacologia. 6ª edição. **Rio de Janeiro: Guabanara, Koogan AS**, 2004.

RIBAS, A. S. D. R. Dissertação (Nutrição, Universidade de Lisboa). Estilos de vida, adiposidade, hormonas e inflamação: influência na incidência e progressão em cancro da mama, próstata e cólon-recto. 2012.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G. R.; HOYLES, L.; MCCARTNEY, A. L.; RASTALL, R.; ROWLAND, I.; GUARNER, F. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. S2, p. S1-S63, 2010.

SALMINEN, L. E.; PAUL, R. H. Oxidative stress and genetic markers of suboptimal antioxidant defense in the aging brain: a theoretical review. **Reviews in the Neurosciences**, v. 25, n. 6, p. 805-819, 2014.

SAVCHENIUK, O. A.; VIRCHENKO, O. V.; FALALYEYeva, T. M.; BEREGOVA, T. V.; BABENKO, L. P.; LAZARENKO, L. M.; SPIVAK, M. Y. The efficacy of probiotics for monosodium glutamate-induced obesity: dietology concerns and opportunities for prevention. **EPMA Journal**, v. 5, n. 1, p. 2, 2014.

SCHLUNDT, J.; SAADBYE, P.; LOHMANN, B. Conjugal transfer of plasmid DNA between *Lactococcus lactis* strains and distribution of transconjugants in the digestive tract of gnotobiotic rats. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 7, n. 2, p. 59-69, 1994.

SENGOTTUVELAN, M.; SENTHILKUMAR, R.; NALINI, N. 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 (BBA)-General Subjects**, v. 1760, n. 8, p. 1175-1183, 2006.

SEARS, C., GARRETT, W. S. Microbios, microbiota e câncer de cólon. **Cell host & microbe**, v. 15, n. 3, p. 317-328, 2014.

SIEGEL, R.; DESANTIS, C.; JEMAL, A. Colorectal cancer statistics, 2014. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 64, n. 2, p. 104-117, 2014.

SILVA, W. J. M. D.; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, p. 441-451, 2011.

SOUZA, C. G., MOREIRA, J. D., SIQUEIRA, I. R., PEREIRA, A. G., RIEGER, D. K., SOUZA, D. O. G., SOUZA T. M., PORTELA L. V., PERRY M. L. Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. **Life sciences**, v. 81, n. 3, p. 198-203, 2007.

SUZUKI, C.; KIMOTO-NIRA, H.; KOBAYASHI, M.; NOMURA, M.; SASAKI, K.; MIZUMACHI, K. Immunomodulatory and cytotoxic effects of various *Lactococcus strains* on the murine macrophage cell line J774. 1. **International journal of food microbiology**, v. 123, n. 1-2, p. 159-165, 2008.

THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. Editora Roca, 2007.

THURNHERR, N.; DESCHNER, E. E.; STONEHILL, E. H.; LIPKIN, M. - Induction of adenocarcinomas of the colon in mice by weekly injections of 1,2-dimethylhydrazine. **Cancer Res.**, 33:940-5, 1973.

TODOROV, S. D.; BOTES, M.; DANOVA, S. T.; DICKS, L. M. T. Probiotic properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* HV219, isolated from human vaginal secretions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 3, p. 629-639, 2007.

VINCENT, T. L.; GATENBY, R. A. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. **International Journal of Oncology**, v.32, n. 4, p. 729-737, 2008

VINEIS, P.; SCHATZKIN, A.; POTTER, J. D. Models of carcinogenesis: an overview. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 10, p. 1703-1709, 2010.

ZHANG, W.; ZHU, Y. H.; ZHOU, D.; WU, Q.; SONG, D.; DICKSVED, J.; WANG, J. F. Oral administration of a select mixture of *Bacillus* probiotics affects the gut microbiota and goblet cell function following *Escherichia coli* challenge in newly weaned pigs of genotype MUC4 that are supposed to be enterotoxigenic *E. coli* F4ab/ac receptor negative. **Applied and environmental microbiology**, v. 83, n. 3, p. e02747-16, 2017.

WARD, J. M. - Morphogenesis of chemically induced neoplasms of the colon and small intestine in rats. **Laboratory Investigation.**, 30:505-13, 1974.

WARDANI, A. K.; EGAWA, S.; NAGAHISA, K.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Computational prediction of impact of rerouting the carbon flux in metabolic pathway on cell growth and nisin production by *Lactococcus lactis*. **Biochemical engineering journal**, v. 28, n. 3, p. 220-230, 2006.

WALDECKER, M.; KAUTENBURGER, T.; DAUMANN, H.; BUSCH, C. SCHRENK, D. Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 19, n. 9, p. 587-593, 2008.

YADAV, H.; JAIN, S.; SINHA, P. R. Effect of Dahi containing *Lactococcus lactis* on the progression of diabetes induced by a high-fructose diet in rats. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 70, n. 5, p. 1255-1258, 2006.

YOUSSEF, K. M.; EZZO, A. M.; EL-SAYED, M. I.; HAZZAA, A. A.; EL-MEDANY, A. H.; ARAFA, M. Chemopreventive effects of curcumin analogs in DMH-Induced colon cancer in albino rats model. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 2, p. 57-72, 2015.