



EFICÁCIA DAS ENTEROCINAS NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER COLORRETAL: UMA ANÁLISE EXPERIMENTAL

EFFECTIVENESS OF ENTEROCINS IN THE DEVELOPMENT OF COLORECTAL CANCER: AN EXPERIMENTAL ANALYSIS

Ana Beatriz Linz Aragão¹, Janaína da Silva Ferreira², Paulo Henrique Silva³, Priscila Ellen da Silva Souza⁴, Dayane da Silva Santos⁵, Elaine Cristina da Silva⁶, Priscilla Régia de Andrade Calaça⁷, Elayne Cristine Soares da Silva⁸, Ana Lúcia Figueiredo Porto⁹, Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares¹⁰

Submetido em: 18/05/2021

e25318

Aprovado em: 08/06/2021

RESUMO

Objetivou-se com este estudo avaliar a eficácia das enterocinas produzidas pela *Enterococcus faecium* 141v e 137v, probióticos, oriundos do queijo de coalho artesanal de Pernambuco sobre o desenvolvimento do câncer colorretal em estudo *in vivo*. Como metodologia foram realizados testes de sensibilidade a protease com a finalidade de comprovar suas propriedades proteicas, além de sua atividade biológica como antimicrobiano. A ultrassonografia foi utilizada para avaliar o efeito das enterocinas sobre o câncer colorretal induzido por 1,2 Dimetilhidrazina (DMH) em ratos Wistar. Os resultados obtidos *in vitro* demonstraram a natureza peptídica das enterocinas bem como sua eficácia quanto à atividade antimicrobiana. Quanto aos resultados *in vivo* avaliados na ultrassonografia, foi possível observar a diminuição na espessura da parede intestinal dos ratos que foram submetidos a indução do câncer colorretal e tratados com as enterocinas, podendo ser explicada pela possível estimulação apoptótica, visando a inibição de células cancerígenas. O presente estudo trouxe aspectos importantes a respeito da utilização das enterocinas para fins terapêuticos, sobretudo na prevenção e controle do câncer colorretal em modelo animal. Também destacou o uso da ultrassonografia para avaliar o efeito das enterocinas sobre o desenvolvimento da doença, mostrando ser um método que considera o bem-estar animal por ser menos invasivo e eficaz. Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a necessidade de estudos que aprofundem o tema. Além disso, agregam conhecimentos em diversas áreas como biotecnologia, microbiologia, medicina, nutrição e farmacologia.

PALAVRAS-CHAVE: Ciências Biológicas. Bactérias Ácido Láticas. Enterocinas. Câncer Colorretal.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the efficacy of enterocins produced by Enterococcus faecium 141v and 137v, probiotics, from artisanal rennet cheese from Pernambuco on the development of colorectal cancer in an in vivo study. As a methodology, protease sensitivity tests were carried out in order to prove its protein properties, in addition to its biological activity as an antimicrobial. Ultrasonography was used to evaluate the effect of Enterocins on colorectal cancer induced by 1,2 Dimethylhydrazine (DMH) in Wistar rats. The results obtained in vitro demonstrated the peptide nature of the Enterocins as well as their effectiveness in terms of antimicrobial activity. As for the in vivo results

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal.

² Universidade Federal Rural de Pernambuco – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal.

³ Universidade Federal Rural de Pernambuco – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal.

⁴ Universidade Federal Rural de Pernambuco – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal.

⁵ Universidade Federal Rural de Pernambuco – Departamento de Genética.

⁶ Universidade Federal Rural de Pernambuco – Centro de Apoio à Pesquisa – CENAPESQ.

⁷ Universidade Federal Rural de Pernambuco – Centro de Apoio à Pesquisa – CENAPESQ.

⁸ Universidade Federal Rural de Pernambuco – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal.

⁹ Universidade Federal Rural de Pernambuco – Laboratório de Tecnologia de Bioativos - LABTECBIO.

¹⁰ Universidade Federal Rural de Pernambuco – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

EFICÁCIA DAS ENTEROCINAS NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER COLORRETAL:
UMA ANÁLISE EXPERIMENTAL

Ana Beatriz Linz Aragão, Janaina da Silva Ferreira, Paulo Henrique Silva, Priscila Ellen da Silva Souza,
Dayane da Silva Santos, Elaine Cristina da Silva, Priscilla Régia de Andrade Calaça,
Elayne Cristine Soares da Silva, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

evaluated on ultrasound, it was possible to observe the decrease in the thickness of the intestinal wall of the rats that underwent colorectal cancer induction and treated with Enterocins, which can be explained by the possible apoptotic stimulation, aiming at the inhibition of cancer cells. This study provided important aspects regarding the use of enterocins for therapeutic purposes, especially in the prevention and control of colorectal cancer in an animal model. Also highlighted the use of ultrasound to evaluate the effect of enterocins on disease development, showing that a method that considers the animal welfare to be less invasive and effective. The results of this study reinforce the need for studies to further investigate the issue. In addition, they add knowledge in several areas such as biotechnology, microbiology, medicine, nutrition and pharmacology.

KEYWORDS: *Biological Science. Lactic Acid Bacteria. Enterocins. Colorectal cancer.*

1 INTRODUÇÃO

O estilo de vida e o tipo de alimentação podem influenciar diretamente na nossa saúde. De acordo com *American Cancer Society* (2019), mais da metade dos cânceres colorretais são atribuíveis a possíveis fatores de risco modificáveis, dentre os quais estão a obesidade, inatividade física, uso prolongado do tabagismo e fatores relacionados à dieta como alimentação pobre em frutas e fibras e o alto consumo de carne vermelha ou processada.

O Câncer Colorretal – CCR é o terceiro tipo de câncer mais incidente em homens e o segundo mais incidente em mulheres no mundo. No Brasil foi estimado que para cada ano do triênio de 2020-2022, em torno de 20.520 novos casos de câncer de cólon e reto em homens e 20.470 em mulheres (INCA, 2020). Devido a sua importância, estudos têm sido realizados com o objetivo de encontrar novas terapias e suporte terapêuticos para auxiliar no tratamento e aumentar a qualidade de vida desses pacientes.

Assim, as bactérias probióticas podem ajudar na melhoria da qualidade de vida de pacientes, pois são importantes para seres humanos e animais no processo de prevenção e retardo da progressão de CCR, estando associadas a mudanças quantitativas e qualitativas favoráveis na microbiota intestinal, e assim promovendo alterações na atividade metabólica e nas condições físico-químicas do intestino (Calaça et al., 2017; Molska & Regula, 2019).

As bactérias ácido lácticas – BAL são melhor caracterizadas como probióticos, que são definidos como “preparações contendo microrganismos e seus metabólitos, usados como aditivos alimentares, e que afetam o organismo hospedeiro de forma benéfica” (Samedi & Charles, 2019). Os principais gêneros que representam as BAL são: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, entre outros (Das et al., 2019).

A principal forma de interação entre as bactérias probióticas e os hospedeiros são os metabólitos secundários, dentre os quais as bacteriocinas são as mais estudadas por participarem da manutenção da homeostase, correspondendo a peptídeos com atividade antimicrobiana em determinadas concentrações (Moreno et al., 2018; Chikindas et al., 2018). Além disso, também desempenham atividade anticancerígena, podendo ser explicada principalmente por sua interação com a membrana



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

EFICÁCIA DAS ENTEROCINAS NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER COLORRETAL:
UMA ANÁLISE EXPERIMENTAL

Ana Beatriz Linz Aragão, Janaina da Silva Ferreira, Paulo Henrique Silva, Priscila Ellen da Silva Souza,
Dayane da Silva Santos, Elaine Cristina da Silva, Priscilla Régia de Andrade Calaça,
Elayne Cristine Soares da Silva, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

alvo, sendo conhecidas por serem “ativos de membrana”, especialmente as bacteriocinas com carga positiva pois se ligam a membrana negativa das células cancerígenas (Baindara; Grover, 2018; Drider et al., 2016).

Dentre as bacteriocinas estudadas estão as enterocinas, que são peptídeos altamente ativos produzidos a partir de *Enterococcus*. As enterocinas apresentam capacidade potencial de melhorar a segurança de produtos alimentícios como bioconservantes naturais. Além disso, não são prejudiciais ao meio ambiente e aos seres humanos, sendo capazes de inibir o crescimento de patógenos (Qiao et al., 2020). Os benefícios fornecidos pelos *Enterococcus* são parcialmente determinados pela produção de enterocina. Por exemplo, *Enterococcus* produtores de enterocinas introduzidos no intestino podem substituir os *Enterococcus* nativos, incluindo cepas resistentes à vancomicina, que não possuem enterocinas (Vasilchenko et al., 2018).

O gênero *Enterococcus*, faz parte das BAL, que pode ser encontrado no solo, na água, em associação com plantas, em produtos fermentados e compoendo parte da microbiota intestinal de vertebrados e invertebrados (García-Solache & Rice, 2019). São cocos Gram-positivos, catalase negativos, encontrados em formas simples, acopladas ou de cadeia curta (Yerlikaya e Akbulut, 2020). Dependendo de sua origem, podem ser caracterizados como microrganismos patogênicos (Hung et al., 2019) ou probióticos (Santos et al., 2019). Atualmente 20 espécies pertencem a este gênero, das quais o *Enterococcus faecium* e o *Enterococcus faecalis* são as mais encontradas e estudadas.

Diante do exposto, a justificativa para esse estudo está baseada nos benefícios da utilização de probióticos, na sua interação com o hospedeiro, e agregados a eles as enterocinas, que por sua natureza catiônica tem a capacidade de se ligar às células cancerígenas, provavelmente induzindo a apoptose dessas células contribuindo para ajudar na prevenção e no controle do câncer colorretal.

Nossa pesquisa isolou as cepas *Enterococcus faecium* 141v e 137v do queijo de coalho artesanal de Pernambuco com o objetivo de avaliar a eficácia da enterocina produzida pelas bactérias probióticas sobre o câncer colorretal, em modelo animal, induzido quimicamente por 1,2-Dimetilhidrazina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMO

As cepas 141v e 137v, sob cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) nº AD77AD8, isoladas do queijo de coalho artesanal de Pernambuco, foram classificadas como *Enterococcus faecium* com base em identificação molecular (Santos et. al. 2020). As cepas foram cultivadas em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS – HiMedia Laboratories Pvt, Ltd. Mumbai, India) a 37 °C e armazenadas a -80°C em caldo MRS. O caldo MRS (HiMedia) foi usado em todos os experimentos.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

EFICÁCIA DAS ENTEROCINAS NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER COLORRETAL:
UMA ANÁLISE EXPERIMENTAL

Ana Beatriz Linz Aragão, Janaina da Silva Ferreira, Paulo Henrique Silva, Priscila Ellen da Silva Souza, Dayane da Silva Santos, Elaine Cristina da Silva, Priscilla Régia de Andrade Calaça, Elayne Cristine Soares da Silva, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

2.2 ISOLAMENTOS DAS ENTEROCINAS 141V E 137V

As cepas de *Enterococcus faecium* 141v e 137v na concentração de 20% (v/v) foram adicionadas ao caldo MRS (deMan, Rogosa e Sharpe – HiMedia Laboratories Pvt, Ltd. Mumbai, India) e incubadas a 37°C por 18 horas. Decorrido esse tempo, o cultivo foi centrifugado a 6.500 rpm por 20 minutos a 4 °C, a seguir o sobrenadante livre de células, contendo a enterocina, teve seu pH ajustado para 6,0 com NaOH 6M e tratado termicamente a 80 °C em banho de ebulição por 10 min. Após esse tratamento, o sobrenadante livre de células foi precipitado com sulfato de amônio na concentração 0%-60% como pré-purificação da Enterocina. O precipitado obtido foi ressuspenso em 20 ml de acetato de amônio (25 Mm, pH 6,5) (Todorov et al., 2010) e utilizado para determinação da atividade antimicrobiana, que foi realizada antes e após a pré-purificação. Foram utilizados os seguintes micro-organismos para a atividade antimicrobiana: *Listeria innocua* ATCC 33090, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 6057 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Mayr-Harting et al., 1972).

2.3 CARACTERIZAÇÃO DE ENTEROCINAS

2.3.1 SENSIBILIDADE A PROTEASE

A natureza peptídica das enterocinas produzidas pelas *Enterococcus faecium* 141v e 137v, foi determinada através da sensibilidade à enzima pepsina (Bromberg et al., 2006). A solução enzimática (0,2 mg/mL pepsina – Sigma-Aldrich®) em solução-tampão HCl 0,02 N esterilizada por filtração (CHROMAFIL® PVDF 0.20 µm/25 mm) foi misturada às enterocinas E141v e E137v na proporção de 1:1 (v/v). A mistura obtida foi incubada a 37 °C por 1 hora, e depois por 5 minutos a 100°C. Em seguida, a atividade antimicrobiana das misturas foi determinada utilizando como bactérias indicadoras *Klebsiella pneumoniae* ATCC 26665, *Enterococcus faecalis* ATCC 6057, *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Os resultados são mostrados na tabela 1.

2.3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As atividades antimicrobianas das enterocinas E141v e E137v foram determinadas por Concentração Mínima Inibitória (CMI). As bactérias indicadoras *Listeria innocua* ATCC 33090, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 6057, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 foram cultivadas em meio caldo Muller Hinton (HiMedia Laboratories Pvt, Ltd. Mumbai, India) e incubadas a 37 °C por 24 horas em condições aeróbias. Os testes foram realizados em triplicata na microplaca de fundo chato com 96 poços, onde foi analisado o controle negativo (100 µL de meio estéril), o controle positivo (100 µL de meio estéril acrescido de 10 µL da bactéria indicadora, ajustada para uma concentração de 10⁷ UFC/mL) e 100 µL das enterocinas E141v e E137v na presença de 10 µL da



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

EFICÁCIA DAS ENTEROCINAS NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER COLORRETAL:
UMA ANÁLISE EXPERIMENTAL

Ana Beatriz Linz Aragão, Janaina da Silva Ferreira, Paulo Henrique Silva, Priscila Ellen da Silva Souza, Dayane da Silva Santos, Elaine Cristina da Silva, Priscilla Régia de Andrade Calaça, Elayne Cristine Soares da Silva, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

bactéria indicadora. As diluições seguiram as proporções 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 e 1:1024 (Mayr-Harting et al. 1972). Após inóculo em placa, a cultura foi incubada a 37 °C por 24 horas, seguida de leitura sob 595 nm de Densidade Óptica (D.O.). As médias dos valores de D.O.595 obtidas foram traçadas em função das concentrações iniciais das enterocinas, após descontar a média dos valores de D.O.595 do meio estéril. A CMI foi considerada como sendo a menor concentração de sobrenadante em que não houve crescimento significativo da bactéria indicadora, por comparação com o controle negativo. Os resultados foram expressos em UA/mL-1.

Unidades arbitrárias "UA" se referem à equação $2n \times 1000/v$, onde (2) representa o fator de diluição, (n) representa a última diluição que produz inibição e (v) significa o volume de enterocina utilizada no teste, corrigida para 1000 µL. Uma UA é definida como a recíproca da maior diluição mostrando inibição do crescimento (Apolônio et al., 2008; Ahmad et al., 2010).

2.4 DESENHO EXPERIMENTAL

2.4.1 ANIMAIS E DIETA

Quarenta ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade albinus, Rodentia), sendo quinze machos e vinte e cinco fêmeas, foram adquiridos e mantidos no Biotério da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e utilizados neste experimento. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com ciclo claro e escuro de 12 horas e temperatura média de 28 ± 2 °C. Os animais receberam água destilada e ração comercial *ad libitum*. Este trabalho respeitou os aspectos éticos da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRPE, sendo aprovado em 10 de janeiro de 2018, sob o número de licença: 001/2018.

2.4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após o período de aclimação, os ratos foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais (n = 5): grupo controle negativo (G1), grupo controle positivo (G2), grupo Enterocina (100 mg/mL) (G3), grupo Enterocina + DMH + vincristina (G4), Grupo Enterocina + DMH (G5), para as fases de pré-indução, indução das lesões neoplásicas e pós-indução. Antes da indução das lesões neoplásicas pelo agente carcinogênico DMH (30mg/kg por aproximadamente 6 semanas). Após indução, a enterocina foi administrada. A fim de obter um efeito direto sobre câncer induzido, 100 mg/mL de enterocina foi administrada diariamente, por sete dias, via intraperitoneal. A definição do tempo de administração foi acordada, devido ao efeito antimicrobiano que a mesma realiza frente a outros microorganismos que também residem no intestino, uma vez que um tempo superior poderia danificar a microbiota colônica. Os animais foram previamente sedados com Xilazina 5 mg/kg e Quetamina 50 mg/kg e para eutanásia com Tiopental sódico 150 mg/kg de acordo com Asha & Gayathri (2012). O desenho experimental é mostrado na figura 1.



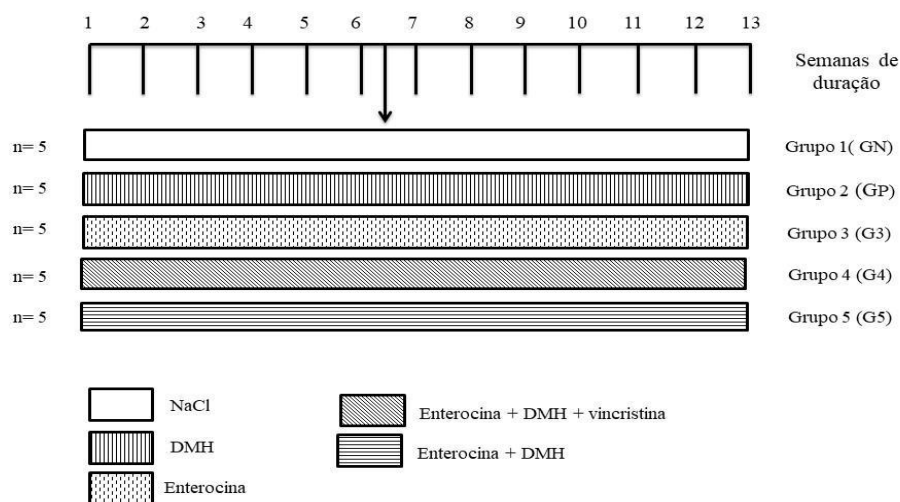
RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

EFICÁCIA DAS ENTEROCINAS NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER COLORRETAL:

UMA ANÁLISE EXPERIMENTAL

Ana Beatriz Linz Aragão, Janaina da Silva Ferreira, Paulo Henrique Silva, Priscila Ellen da Silva Souza, Dayane da Silva Santos, Elaine Cristina da Silva, Priscilla Régia de Andrade Calaça, Elayne Cristine Soares da Silva, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

Figura 1. Protocolo experimental de 1, 2-DimetilHidrazina (30 mg/kg) para indução do câncer colorretal em ratos Wistar.



Fonte: Os autores

2.5 ULTRASSONOGRRAFIA ABDOMINAL PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ENTEROCINA SOBRE O CÂNCER COLORRETAL

Os ratos Wistar foram devidamente contidos, sem necessidade de sedação, para realização dos exames ultrassonográficos. Os mesmos foram realizados na região abdominal, permitindo uma avaliação prévia e acompanhamento do procedimento experimental. Foi utilizado o aparelho M-turbo (Sonosite®), com transdutor linear de frequência de 6 a 13 MHz. Os parâmetros avaliados foram as espessuras da parede intestinal em vários segmentos, além da existência de irregularidade na mesma. Os exames foram executados pela mesma operadora, sendo realizados no Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE. Para acompanhamento do efeito da enterocina sobre o câncer e os possíveis efeitos anatomopatológicos que ela poderia apresentar, foram realizadas ultrassonografias antes, durante e após a indução do câncer.

3 RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA ENTEROCINA QUANTO AO SEU PERFIL PROTEICO



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

EFICÁCIA DAS ENTEROCINAS NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER COLORRETAL:
UMA ANÁLISE EXPERIMENTAL

Ana Beatriz Linz Aragão, Janaina da Silva Ferreira, Paulo Henrique Silva, Priscila Ellen da Silva Souza,
Dayane da Silva Santos, Elaine Cristina da Silva, Priscilla Régia de Andrade Calaça,
Elayne Cristine Soares da Silva, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

De acordo com os testes realizados com as enterocinas produzidas por E141v e E137v após o tratamento com a enzima digestiva (pepsina), os resultados demonstraram o decréscimo da atividade antimicrobiana, perdendo parcialmente ou totalmente a atividade, contra as bactérias indicadoras *Klebsiella pneumoniae* ATCC 26665, *Enterococcus faecalis* ATCC 6057 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633, como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1. Inibição de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 26665, *Enterococcus faecalis* ATCC 6057 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pelas enterocinas obtidas através de cultivo de *Enterococcus faecium* 141v e 137v, após tratamento realizado com enzima proteolítica para determinação da natureza do composto inibidor.

Cepas indicadoras	UA/mL ⁻¹	
	E141v	E137v
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 29665	13	13
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 6057	53	53
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0	13

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA ENTEROCINA QUANTO A SUA FUNÇÃO BIOLÓGICA

Para a caracterização das enterocinas isoladas E141v e E137v quanto a sua função biológica, a atividade antimicrobiana delas foi realizada. Em todos os casos, foi possível observar que as enterocinas foram eficazes frente aos agentes patogênicos, destacando a E137V, que apresentou eficácia frente a maioria dos microrganismos testados, tendo sua maior titulação contra *Listeria innocua* ATCC 33090, enquanto que E141v obteve maior titulação para *Enterococcus faecalis* ATCC 6057, como pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana das enterocinas E141v e E137v isoladas a partir de *Enterococcus faecium* oriundos de queijo de coalho artesanal em condições variadas determinadas pelo método de diluição crítica.

Cepas indicadoras	UA/mL ⁻¹	
	E141v	E137v
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	27	27
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 29665	107	53



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

EFICÁCIA DAS ENTEROCINAS NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER COLORRETAL:
UMA ANÁLISE EXPERIMENTAL

Ana Beatriz Linz Aragão, Janaina da Silva Ferreira, Paulo Henrique Silva, Priscila Ellen da Silva Souza,
Dayane da Silva Santos, Elaine Cristina da Silva, Priscilla Régia de Andrade Calaça,
Elayne Cristine Soares da Silva, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	53	27
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 6057	427	107
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	27	27
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	213	853
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	53	3.413

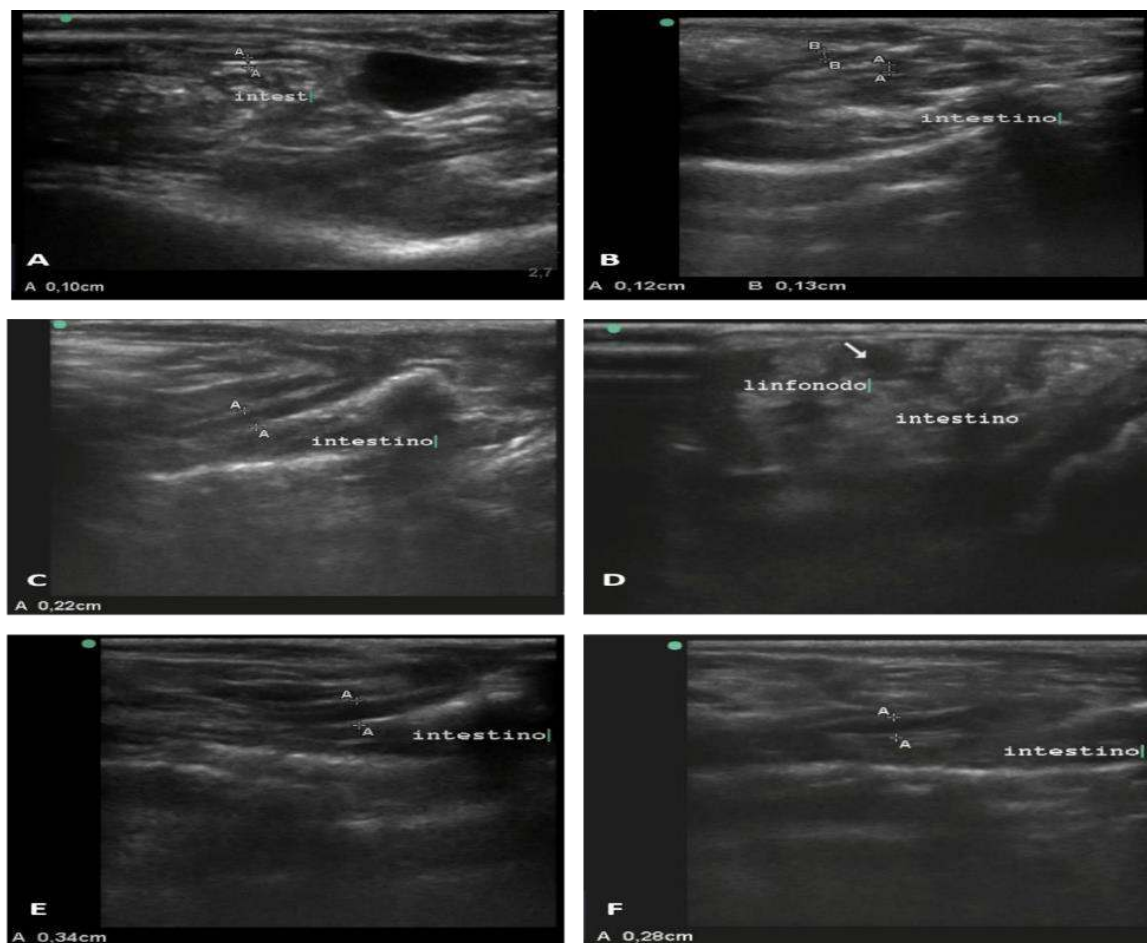
3.3 EFEITO DA ENTEROCINA APLICADA SOBRE O CÂNCER COLORRETAL

Nos ratos submetidos a indução do câncer colorretal foi observado, por meio da ultrassonografia abdominal, um aumento na espessura da parede intestinal, medindo em média 0,24 cm. Já os ratos submetidos a indução do câncer e tratados com as enterocinas apresentaram uma leve diminuição na espessura da parede intestinal, em torno de 0,23cm, como mostra a tabela 3 e figura 2. Além disso, na avaliação clínica, em alguns animais do grupo 5, foi observado de forma eventual, diarreia com muco, mas não houve reduções em suas massas corporais quando comparado ao controle positivo.

Tabela 3. Média da espessura em centímetros (cm) da parede intestinal observada em exames de ultrassonografia, realizados nos grupos de ratos wistar induzidos com DMH para câncer colorretal.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Pré-indução	0,11 cm	0,10 cm	0,12 cm	0,13 cm	0,12 cm
Durante indução	0,11 cm	0,18 cm	0,12 cm	0,14 cm	0,14 cm
Pós- indução	0,11 cm	0,24 cm	0,12 cm	0,24 cm	0,23 cm

Figura 2. Espessura da parede intestinal visibilizada por ultrassonografia abdominal, em ratos submetidos a suplementação com enterocina na concentração de 100 (mg/mL).



Fonte: os autores.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, foram realizados experimentos *in vitro* e *in vivo*, buscando conhecer melhor os efeitos das enterocinas produzidas pelos *E. faecium* 137V e 141V no controle do desenvolvimento do câncer colorretal induzido por DMH e avaliado por ultrassonografia. O potencial das enterocinas pode ser comprovado a partir da análise das imagens obtidas nos grupos de animais submetidos ao experimento. Onde o grupo com a administração suplementar das enterocinas, apresentou um menor espessamento da parede intestinal, significando uma menor progressão do câncer, tendo em vista que uma das características do câncer colorretal é o espessamento de parede intestinal observado claramente nos animais com câncer e sem nenhum tratamento.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

EFICÁCIA DAS ENTEROCINAS NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER COLORRETAL:
UMA ANÁLISE EXPERIMENTAL

Ana Beatriz Linz Aragão, Janaina da Silva Ferreira, Paulo Henrique Silva, Priscila Ellen da Silva Souza,
Dayane da Silva Santos, Elaine Cristina da Silva, Priscilla Régia de Andrade Calaça,
Elayne Cristine Soares da Silva, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

A diminuição do espessamento da parede provavelmente foi em decorrência do aumento de apoptose nas células doentes induzidas pelas enterocinas. Esse provável aumento do apoptose, pode ser explicado pelo fato que as enterocinas são catiônicas por natureza, e por isso, elas se ligam a membrana da célula maligna que apresenta certas diferenças em relação as saudáveis, possuindo um potencial de membrana negativo que contribui para atividade citotóxica seletiva dos peptídeos (Hoskin; Ramamoorthy, 2008).

Além disso, Ahmadi et al. (2017), realizaram estudos para avaliar *in vitro* o impacto da bacteriocina nisina no índice apoptótico e alteração na expressão de dois genes principais, bax e bcl-2, na via apoptótica intrínseca de células cancerosas colorretais. Os resultados do estudo revelaram que o tratamento com nisina tem impactos citotóxicos nas linhagens de células de câncer SW480 e induz a apoptose por meio do aumento da razão bax / bcl-2 nos níveis de mRNA e proteína em comparação com o controle negativo, sugerindo que essa bacteriocina pode induzir a apoptose por vias intrínsecas e levar a morte de células cancerosas.

Outro estudo *in vitro*, realizado por Ankaiah et al. (2017), avaliaram o efeito de enterocinas isoladas a partir de bactérias ácido lácticas sobre células do câncer, dentre eles o câncer colorretal, como HT-29 e Caco-2. Por meio do ensaio MTT, os autores observaram a atividade inibitória do crescimento das células do câncer pelas bacteriocinas, sendo elevada progressivamente de acordo com o tempo de incubação. Resultados semelhantes foram demonstrados por Haghshenas et al. (2014) que evidenciaram o aumento da citotoxicidade em células cancerígenas como HT-29 tratadas com metabólitos de origem peptídica de cepas do gênero *Lactobacillus*, a apoptose foi demonstrada através de imagens microscópicas e para avaliar a quantidade de células apoptóticas foi utilizada a citometria de fluxo. Apesar desse assunto ser muito importante para a saúde da população, ainda temos poucos trabalhos disponíveis sobre os impactos das enterocinas em células do câncer, mas todos caminham na mesma direção, ou seja, a capacidade citotóxica das bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas, como as deste estudo.

Com esse resultado podemos sugerir o caráter positivo da suplementação com as enterocinas, pois, além dessa diminuição do espessamento, foi observado no quadro clínico dos animais uma melhora no aspecto geral de qualidade de vida, como por exemplo sem haver perda de peso nos ratos suplementados, nem diarreia, essas características são comuns em pacientes com câncer colorretal e trazem um desconforto clínico. Outro fato a destacar é a natureza peptídica das enterocinas ter sido comprovada pela degradação delas com diminuição do efeito biológico testado, no caso a atividade antimicrobiana, e isso pode ter refletido nos resultados de controle do desenvolvimento do câncer colorretal. Essa natureza peptídica já foi relatada em vários trabalhos anteriores, como por exemplo: Moreno et al. (2000), Avaiyarasi et al. (2016) e Katharopoulos et al. (2016), que avaliaram a atividade antimicrobiana de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus sakei* e *Lactobacillus lactis* e observaram a



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

EFICÁCIA DAS ENTEROCINAS NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER COLORRETAL:
UMA ANÁLISE EXPERIMENTAL

Ana Beatriz Linz Aragão, Janaina da Silva Ferreira, Paulo Henrique Silva, Priscila Ellen da Silva Souza, Dayane da Silva Santos, Elaine Cristina da Silva, Priscilla Régia de Andrade Calaça, Elayne Cristine Soares da Silva, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

perda dessa atividade após tratamento enzimático com enzimas proteolíticas e lipolíticas indicando a sua natureza peptídica.

O perfil de espectro da atividade antimicrobiana foi diferente entre as enterocinas, resultados esses já esperados, pois trata-se de dois micro-organismos. Mesmo assim, as enterocinas foram ativas principalmente contra *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria innocua*. Todas as bactérias mencionadas, de acordo com Bromberg et al. (2006), são bactérias patogênicas pouco afetadas por bacteriocinas, o que demonstra a eficácia das enterocinas quanto a seu potencial antimicrobiano. Além disso, com exceção da *Klebsiella pneumoniae*, todas as bactérias mencionadas são gram-positivas o que pode explicar a eficácia da atividade das enterocinas, pois, em geral, a membrana citoplasmática de bactérias gram-positivas é o principal alvo da ação das bacteriocinas (Garneau et. al., 2002). A utilização de substâncias antimicrobianas, como as enterocinas, no tratamento de algumas doenças, como o próprio câncer colorretal, se mostra de grande importância, pois elas apresentam diferenças com os antibióticos convencionais, por exemplo: são sintetizadas nos ribossomos; possuem um espectro bactericida restrito; atuam na formação de poros na membrana celular e/ou interferem na biossíntese de parede, proteínas, DNA e RNA, no caso desse estudo, dos microrganismos patogênicos; não possuem toxicidade em células eucarióticas; e as células produtoras de enterocinas possuem imunidade à elas, entre outras diferenças (Ogaki et. al., 2015). Sendo assim, uma das grandes vantagens em sua utilização além de ser uma substância natural, é que os micro-organismos benéficos da microbiota não são afetados, o que promove maior equilíbrio auxiliando na prevenção e tratamento do câncer colorretal.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo trouxe aspectos importantes a respeito da utilização das enterocinas para fins terapêuticos, sobretudo na prevenção e controle do câncer colorretal em modelo animal. Também destacou o uso da ultrassonografia para avaliar o efeito das enterocinas sobre o desenvolvimento da doença, mostrando ser um método que considera o bem-estar animal por ser menos invasivo e eficaz. O queijo de coalho artesanal de Pernambuco apresenta uma comunidade de bactérias ácido lácticas estrategicamente organizada, entre elas, as *Enterococcus faecium* e por apresentar em sua microbiota cepas de interesse tecnológico e farmacêutico, torna-se atraente para o consumo, bem como para pesquisas relacionadas à saúde. Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a necessidade de estudos que aprofundem o tema. Além disso, agregam conhecimentos em diversas áreas como biotecnologia, microbiologia, medicina, nutrição e farmacologia.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPQ, ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação-PIBITI, Coordenação



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

EFICÁCIA DAS ENTEROCINAS NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER COLORRETAL:
UMA ANÁLISE EXPERIMENTAL

Ana Beatriz Linz Aragão, Janaina da Silva Ferreira, Paulo Henrique Silva, Priscila Ellen da Silva Souza, Dayane da Silva Santos, Elaine Cristina da Silva, Priscilla Régia de Andrade Calaça, Elayne Cristine Soares da Silva, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES e a Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE.

REFERÊNCIAS

- AHMADI, S.; GHOLLASI, M.; HOSSEINI, H. M. The apoptotic impact of nisin as a potent bacteriocin on the colon cancer cells. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p. 193-197, 2017.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures**. Atlanta: American Cancer Society, 2019.
- ANKAIAH, D.; PALANICHAMY, E.; PERUMAL, V. *et al.* Probiotic characterization of *Enterococcus faecium* por1: Cloning, over expression of Enterocin-A and evaluation of antibacterial, anticancer properties. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 280–292, 2017.
- APOLÔNIO, A. C. M. Purification and partial characterization of a bacteriocina produced by *Eikenella corrodens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 508-514, 2008.
- ASHA, Gayathri Devaraja. Synergistic impact of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and vincristine on 1,2-dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis in mice. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 3, p. 1049–1054, 2012.
- AVAIYARASI, N. D.; RAVINDRAN, A. D.; VENKATESH, P.; ARUL, V. *In vitro* selection, characterization and cytotoxic effect of bacteriocin of *Lactobacillus sakei* GM3 isolated from goat milk. **Food Control**, v. 69, p. 124-133, 2016.
- BAINDARA, P. K.; GROVER, V. Bacteriocins: perspective for the development of novel anticancer drugs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 10393-10408, 2018.
- BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R. R.; CINTRA, H. C. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 26, p. 135-144, 2006.
- CALAÇA, P. R. A.; BEZERRA, R. P.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, M. T. H. Podem as bactérias ácido lácticas probióticas apresentarem efeito antitumoral em modelo animal de câncer de cólon? Uma revisão da literatura. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 587-592, 2017.
- CHIKINDAS, M. L.; WEEKS, R.; DRIDER, D.; CHISTYAKOV, V.; DICKS, L. M. T. Functions and emerging applications of bacteriocins. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 23-28, 2018.
- DAS, A. J.; DAS, M. J.; MIYAJI, T. *et al.* Growth and metabolic characterization of four lactic acid bacteria species isolated from rice beer prepared in Assam, India. **Access Microbiology**, v. 1, p. 1-14, 2019.
- DRIDER, D.; BENDALI, F.; NAGHMOUCHI, K.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: Not Only Antibacterial Agents. **Probiotics & Antimicro**, v. 8, p. 177-182, 2016.
- FRANZ, C. M. A. P.; BELKUM, M. J. V.; HOLZAPFEL, W. H.; ABRIQUEL, H.; GALVEZ A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 3, p. 293-310, 2007.
- GARCIA-SOLACHE, M.; RICE, L. B. The *Enterococcus*: a Model of Adaptability to Its Environment. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, p. 1-28, 2019.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR
ISSN 2675-6218

EFICÁCIA DAS ENTEROCINAS NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER COLORRETAL:
 UMA ANÁLISE EXPERIMENTAL

Ana Beatriz Linz Aragão, Janaina da Silva Ferreira, Paulo Henrique Silva, Priscila Ellen da Silva Souza,
 Dayane da Silva Santos, Elaine Cristina da Silva, Priscilla Régia de Andrade Calaça,
 Elayne Cristine Soares da Silva, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

GARNEAU, S.; MARTIN, N. I.; VEDERAS, J. C. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Biochimie**, v. 84, p. 577–592, 2002.

HAGHSHEENAS, 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.

HOSKIN, D. W.; RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochim Biophys Acta**, v. 1778, p. 357–375, 2008.

HUNG, W.; CHEN, Y.; TSENG, S. *et al.* Using *groEL* as the target for identification of *Enterococcus faecium* clades and 7 clinically relevant *Enterococcus* species. **Journal of microbiology, immunology and infection**, v. 52, p. 255-264, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. **Estimativa 2018**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer, 2020.

KATHAROPOULOS, E.; TOULOUPI, K.; TOURAKI, M. Monitoring of multiple bacteriocins through a developed dual extraction protocol and comparison of HPLC-DAD with turbidometry as their quantification system. **Journal of Microbiological**, v. 127, p. 123-131, 2016.

MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A. J.; BERKELEY, R. C. W. Methods for studying bacteriocins. In: NORRIS, J. R.; RIBBONS, D. W. (Ed.) **Methods in Microbiology**. New York, v. 7, p. 315-422, 1972.

MOLSKA M.; REGUŁA J. Potential Mechanisms of Probiotics Action in the Prevention and Treatment of Colorectal Cancer. **Review Nutrients**, v. 11, p. 1-17, 2019.

MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; BALDINI, V. L. S.; LEITÃO, M. F. F. Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 184-192, 2000.

MORENO, I.; VENKATESWARULU, T. C.; PRABHAKAR, K. V.; PEELE, K. A.; KRUPANIDHI, S. (2018). Isolation and characterization of bacteriocin producing *Enterococcus casseliflavus* and its antagonistic effect on *Pseudomonas aeruginosa*. **Karbala International Journal of Modern Science**, v. 4, p. 361-368, 2018.

QIAO, X.; DU, R.; WANG, Y.; HAN, Y.; ZHOU, Z. (2020). Purification, characterization and mode of action of enterocin, a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* TJUQ1. **Int J Biol Macromol**, v. 1, n. 144, p. 151-159, 2020.

SAMEDI, L.; CHARLES, A. L. (2019). Evaluation of Technological and Probiotic Abilities of Local Lactic Acid Bacteria. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 7, p. 9-19, 2019.

SANTOS, D. S.; CALAÇA, P. R. A.; PORTO, A. L. F. *et al.* (2020). What Differentiates Probiotic from Pathogenic Bacteria? The Genetic Mobility of *Enterococcus faecium* Offers New Molecular Insights. **OMICS A Journal of Integrative Biology**, v. 24, p. 1-9, 2020.

SANTOS, D. S.; CALAÇA, P. R. A.; PORTO, A. L. F. *et al.* Caracterização parcial probiótica e molecular de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de coalho da cidade de Arcoverde - Pernambuco. **Iniciação Científica – CESUMAR**, v. 21, p. 7-14, 2019.

TODOROV, S. D. Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from Beloura and Chouriço, traditional pork products from Portugal. **Meat Science**, v. 84, p. 334-343, 2010.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR
ISSN 2675-6218

**EFICÁCIA DAS ENTEROCINAS NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER COLORRETAL:
UMA ANÁLISE EXPERIMENTAL**

Ana Beatriz Linz Aragão, Janaina da Silva Ferreira, Paulo Henrique Silva, Priscila Ellen da Silva Souza,
Dayane da Silva Santos, Elaine Cristina da Silva, Priscilla Régia de Andrade Calaça,
Elayne Cristine Soares da Silva, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

VASILCHENKO, A. S.; VASILCHENKO, A. V.; VALYSHEV, A. V.; ROGOZHIN, E. A. A Novel High-Molecular-Mass Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium*: Biochemical Features and Mode of Action. **Probiotics Antimicrob Proteins**, v. 10, p. 427-434, 2018.

YERLIKAYA, O.; AKBULUT, N. *In vitro* characterisation of probiotic properties of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* strains isolated from raw milk and traditional dairy products. **International Journal of Dairy Technology**, v. 73, p. 98-107, 2020.