PERFIL DA MICROBIOTA INSTESTINAL DE RATOS SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA - RESULTADOS PRELIMINARES

Deise Jaqueline Stroher [1]

Jonathan Bordin [2]

Cheila Stopglia [3]

Resumo:

O intestino é colonizado por aproximadamente 100 trilhões de micro-organismos que compõem a sua microbiota e assumem papeis importantes como proteção, incluindo o desenvolvimento de componentes do sistema imunitário e da mucosa intestinal, além de funções estruturais. A alimentação possui grande importância para a colonização de micro-organismos na microbiota intestinal. Os óleos vegetais são utilizados na suplementação alimentar devido às suas características funcionais, como o óleo de cártamo, o óleo de chia e o óleo de coco. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar o perfil da microbiota intestinal de ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica. Foi utilizado um grupo de 15 ratos machos Wistar, divididos em cinco grupos. O grupo 1 recebeu uma dieta normolipídica (NMD) e os demais grupos uma dieta hiperlipídica (HFD) durante 90 dias. Após esse período, os animais foram suplementados durante 30 dias com diferentes tratamentos, sendo o Grupo 1 (NMD): 2 mL/kg de solução salina v.o; Grupo 2 (HFD): 2 mL/kg de solução salina v.o; Grupo 3 (HFD+CAR): 2mL/kg de óleo de cártamo v.o; Grupo 4 (HFD+CHI): 2mL/kg de óleo de chia v.o; Grupo 5 (HFD+COC): 2mL/kg de óleo de coco v.o.). A pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa, sob protocolo nº042/2015. Após esse período de suplementação, foram coletados swabs retais, os quais foram adicionados em 2mL de solução salina 0,9%. Foram realizadas diluições seriadas (1:10 e 1:100) e alíquotas de cada diluição foram semeadas em placas contendo ágar manitol, ágar Salmonella-Shigella, ágar sangue e ágar MacConkey. Placas foram incubadas em 35ºC/24h. As colônias isoladas foram avaliadas pela técnica de coloração de gram. A determinação do número de bactérias heterotróficas foi realizada por semeadura em profundidade. Foram isolados um total de 76 micro-organismos, que diferiram apenas quanto ao número de micro-organismos aeróbios crescidos no ágar MacConkey, para o qual houve um pequeno aumento no grupo G2, possivelmente influenciado pela dieta hiperlipídica. Além disso, o grupo suplementado com óleo de chia (G4), apresentou o maior número de micro-organismos isolados nesse meio de cultura. No entanto, os animais que receberam dieta a base de óleo de cártamo (G3) e coco (G5) apresentaram resultados semelhantes ao grupo que recebeu dieta normolipídica. Posteriormente, após a realização das provas de identificação, poderá ser traçado um perfil da microbiota intestinal dos animais comparando as suplementações.

Palavras-chave: dieta hiperlipídica; microbiota intestinal; óleos vegetais

Modalidade de Participação: Pós-Graduação

PERFIL DA MICROBIOTA INSTESTINAL DE RATOS SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA - RESULTADOS PRELIMINARES

[1] Aluno de pós-graduação. stroherdeise@gmail.com. Autor principal

[2] Aluno de graduação. jonathanteixeira.rs@hotmail.com. Apresentador

[3] Docente. cheila.dos@gmail.com. Orientador

ANÁLISE DO PERFIL DA MICROBIOTA INSTESTINAL DE RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA – RESULTADOS PRELIMINARES

1 INTRODUÇÃO

O intestino é colonizado por aproximadamente 100 trilhões de micro-organismos que compõem a sua microbiota (TREMAROLI; BACKHED, 2012). Essa colonização é adquirida após o primeiro contato com o mundo externo, já que o feto se desenvolve no útero materno, ambiente considerado livre de contaminação, e a partir desse momento, diversos outros fatores contribuem para a consolidação dessa população de micro-organismos, resultando em uma microbiota única para cada indivíduo (AAGAARD *et al*., 2014; GUARALDI & SALVATORI, 2012). O intestino abriga milhares de diferentes micro-organismos que assumem papeis importantes como proteção, incluindo o desenvolvimento de componentes do sistema imunitário e da mucosa intestinal, além de funções estruturais e metabólicas (MISHRA & DUBEY, 2016).

A alimentação possui grande importância para a colonização de micro-organismos na microbiota intestinal. Dessa forma, é possível compreender como os diferentes hábitos alimentares influenciam na diversidade da microbiota (HEIMAN; GREENWAY, 2016). Assim, o processo de desenvolvimento dessa colonização, é influenciado pelos alimentos que compõem a dieta do hospedeiro, como os ricos em fibras e carboidratos fermentáveis, que favorecem a redução de lipídios de baixa densidade. Já as dietas ricas em gordura e proteína de origem animal favorecem a produção de ácidos biliares hepáticos (ROBERFROID et al., 2010). No sistema nervoso central (SNC) a microbiota intestinal influência tanto no desenvolvimento quanto no funcionamento de fatores, como o comportamento. Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), são capazes de estimular o sistema nervoso autônomo (SNA), interferindo diretamente na memória e na capacidade de aprendizado (CARABOTTI *et al*., 2015).

Os óleos vegetais fazem parte de um dos principais produtos extraídos das plantas, e muitos deles são utilizados em produtos alimentícios, fazendo parte da dieta humana, pois possuem características funcionais para nutrição e manutenção da vida dos seres vivos. Das sementes do açafrão, iguaria popularmente conhecida e utilizada, é extraído o óleo de cártamo, que contém elevado valor dietético muito usado atualmente como suplemento alimentar, sendo uma fonte rica em α-tocoferóis, com potente ação antioxidante (EKIN, 2005; KOYAMA *et al.*, 2006; PINTÃO *et al.*, 2008; VOSOUGHKIA *et al*., 2011).

Salvia hispanica, mais conhecida como chia, é uma planta herbácea originária do México, que é composta principalmente por lipídeos, proteínas e fibras, sendo amplamente utilizada na alimentação funcional. Das suas sementes é extraído o óleo de chia que possui alto valor nutricional, pois apresenta em sua composição uma predominância de ácidos graxos poli-insaturados que auxiliam no controle do peso corporal (GANZAROLI *et al.,* 2012; LEON *et al*., 2010; SALGADO-CRUZ *et al.,* 2005).

Já o óleo de coco, é um óleo vegetal extraído da prensagem da polpa ou cerne do coco (*Cocos nucifera*) e sua utilização na suplementação alimentar ocorre devida a sua composição aproximada de 65% de ácidos graxos de cadeia média, que após sua absorção, são transportados do intestino diretamente para o fígado, onde se transformam em energia e, por serem armazenados nos adipócitos, não promovem ganho de peso como os demais óleos de cadeia curta (BHATNAGAR *et al*., 2009; DAYRIT, 2014). (CARDOSO *et al*., 2015).

Em estudo realizado por Cani e colaboradores (2007), que avaliou camundongos submetidos a dietas hiperlipídicas, resultou em uma diminuição significativa no número de Bifdobacterium, Bacteroides e no grupo Clostridium coccoides Eubacterium rectal, aumentando a relação de bactérias Gram positivas e Gram negativas.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é realizar uma análise do perfil da microbiota intestinal de ratos *Wistar* submetidos à dieta hiperlipídica.

2 METODOLOGIA

Foi utilizado um grupo de 15 ratos machos da linhagem *Wistar*, que foi dividido em cinco grupos. Durante o período 120 dias, os animais foram mantidos em instalações adequadas, respeitando o ciclo de 12 horas claro/escuro.

O grupo 1 (G1) recebeu uma dieta normolipídica (NMD) e os demais grupos, grupo 2 (G2), grupo 3 (G3), grupo 4 (G4) e grupo 5 (G5) receberam uma dieta hiperlipídica (HFD) durante o período de 90 dias. Após esse período, os animais de todos os grupos foram suplementados com diferentes tratamentos, sendo: G1 (NMD): 2mL/Kg de solução salina v.o., G2 (HFD): 2mL/Kg de solução salina v.o., G3 (HFD): 2mL/Kg de óleo de cártamo v.o., G4 (HFD): 2mL/Kg de óleo de chia v.o. e G5 (HFD): 2mL/Kg de óleo de coco v.o. A utilização desses animais para esse fim foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brasil (Protocolo nº 042/2015).

A coleta das amostras da microbiota intestinal foi realizada com o auxílio de um *swab* estéril na região anal dos animais e adicionadas em um tubo contendo 2mL de solução salina 0,9%. Após a coleta, as amostras foram incubadas em estufa a 35ºC/1h. Após o período de incubação, foram realizadas diluições seriadas (1:10 e 1:100) e uma alíquota de 100µL de cada diluição foi semeada com o auxílio de uma alça de Drigalski, pela técnica de espalhamento em superfície em quatro diferentes meios de cultura, sendo: ágar manitol (MA), ágar *Salmonella-Shigella* (SS), ágar sangue (AS) e ágar MacConkey (MC) (MILANEZI, 2013). Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa a 35ºC/24h e após esse período, as colônias com morfologias distintas foram isoladas, armazenadas e avaliadas pela técnica de coloração de Gram.

Para a determinação do número de bactérias heterotróficas presentes nas amostras foram realizadas diluições seriadas (1:1, 1:10 e 1:100) e uma alíquota de 100µL de cada diluição foi semeada *pour plate* em placas contendo *Plate count agar* (PCA), em duplicata. As placas foram incubadas em estufa a 35ºC/24h. Após esse período, foram selecionadas as placas que apresentaram entre 20 e 200 unidades formadoras de colônias (UFC).

3 RESULTADOS PRELIMINARES

A partir das semeaduras realizadas nos diferentes meios de cultura, foram isolados um total de 76 micro-organismos, conforme descrito na Tabela 1. Não houve crescimento de micro-organismos no meio de cultura SS. A determinação do número de bactérias heterotróficas nas amostras aparece descrita na Tabela 2.

Tabela 1 – Total de micro-organismos isolados nos diferentes meios de cultura.

Meio de cultura	**G1** NMD/90d NMD+SA/30d	**G2** HFD/90d HFD+SA/30d	**G3** HFD/90d HFD+CA/30d	**G4** HFD/90d HFD+CH/30d	**G5** HFD/90d HFD+CO/30d
MA	06	06	04	06	05
SS	-	-	-	-	-
AS	08	07	09	07	08
MC	-	03	-	07	-
Total	**14**	**16**	**13**	**20**	**13**

Fonte: dados da pesquisa. MA – ágar manitol, SS – ágar *Salmonella-Shigella*; MC – ágar MacConkey; NMD – normolipídica; HFD – hiperlipídica; AS – solução salina; CA – óleo de cártamo; CH – óleo de chia; CO – óleo de coco.

De acordo com os resultados obtidos, é possível perceber que a dieta não influenciou o crescimento de micro-organismos aeróbios no MA, meio de cultura seletivo e diferencial para o gênero *Staphylococcus*, assim como aconteceu no meio nutritivo ágar sangue. Contudo, comparando o número de micro-organismos aeróbios crescidos no ágar seletivo para bactérias gram-negativas (MC), observa-se que houve um pequeno aumento no grupo G2, possivelmente influenciado pela dieta hiperlipídica. Além disso, o grupo tratado com óleo de chia (G4), apresentou o maior número de micro-organismos isolados nesse meio de cultura. No entanto, os animais que receberam dieta a base de óleo de cártamo (G3) e coco (G5) apresentaram resultados semelhantes ao grupo que recebeu dieta normolipídica. Estudos posteriores de identificação dos micro-organismos e dosagens bioquímicas poderão confirmar se os óleos em questão desempenharam um efeito protetor na microbiota dos ratos avaliados.

Tabela 2: Contagem total de micro-organismos heterotróficos em UFC/g

G1	**G2**	**G3**	**G4**	**G5**
NMD/90d NMD+SA/30d	HFD/90d HFD+SA/30d	HFD/90d HFD+CA/30d	HFD/90d HFD+CH/30d	HFD/90d HFD+CO/30d
$4x10^4$ UFC/g	$7,2x10^3$UFC/g	$3,6x10^3$UFC/g	$6,8x10^4$UFC/g	$1,3x10^4$UFC/g

Fonte: dados da pesquisa

Quanto a contagem total de micro-organismos, que avalia a presença de micro-organismos anaeróbios, não houve diferença entre os grupos.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados preliminares obtidos, já é possível perceber que a dieta hiperlipídica alterou a microbiota intestinal dos animais quando comparado a dieta normolipídica. Após as provas de identificação dos micro-organismos isolados, poderá ser traçado um perfil da microbiota intestinal dos animais comparando as suplementações.

REFERÊNCIAS

AAGAARD, K. et al. The placenta harbors a unique microbiome. **Science Translational Medicine,** v. 65, n. 237, p. 1-11, 2014.

BHATNAGAR, A. S. et al. Fatty acid composition, oxidative stability, and radical scavenging activity of vegetable oil blends with coconut oil. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 86, n. 10, p. 991-999, 2009.

CANI, P. D.; DELZENNE, N. M. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. **Current pharmaceutical design**, v. 15, n.13, p.1546-1558, 2009.

CARABOTTI M. et al. The gut-brain axis: Interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. **Annals Gastroent**. 2015; 28:203-9.

CARDOSO, D. A. et al. A coconut extra virgin oil-rich diet increases HDL cholesterol and decreases waist circumference and body mass in coronary artery disease patients. **Nutricion Hospitalária**, v. 32, n. 5, p. 2144-2152, 2015.

DAYRIT, F. M. Lauric acid is a medium-chain fatty acid, coconut oil is a mediumchain triglyceride. **Philippine Journal of Science**, v. 143, n. 2, p. 157-166, 2014.

EKIN, Zehra et al. Resurgence of safflower (Carthamus tinctorius L.) utilization: a global view. **Journal of Agronomy**, v. 4, n. 2, p. 83-87, 2005.

GANZAROLI, J. F; TANAMATI, A.; SILVA, M. V. Avaliação do Teor de Lipídeos Totais e da Composição de Ácidos Graxos de Semente Salvia Hispânica L (chia). In: **XVII Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR**. Campo Mourão, 2012.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 4. ed. Barueri: Manole, 2011.

GUARALDI, F.; SALVATORI, G. Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 1-4, 2012.

KOYAMA N, Kuribayaschi K, Seki T, Kobayashi K, Furuhata Y, Suzuki K, Arisaka H, Nakano T, Amino Y, Ishii K. Serotonin derivatives, major safflower (*Carthamus tinctorius L.*) seed antioxidants, inhibit low density lipoprotein (LDL) oxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **J Agric Food Chem**.2006.

LEON, S.V. et al. Adición de aceite de chía (Salvia hispanica) como fuente de ácidos grasos omega 3 en chorizo. In: ALONSO, F. J. F. AVANCES EN LA INVESTIGACIÓN DE LA ALIMENTACIÓN FUNCIONAL.

MILANEZI, Ana Carolina Medeiros. Estudo do perfil da microbiota intestinal em modelo experimental de colite ulcerativa induzida em camundongo da linhagem C57BL/6. 2013.

MISHRA, A. K.; DUBEY, V. Obesity: An overview of possible role(s) of gut hormones, lipid sensing and gut microbiota. **Metabolism**, v. 65, p. 48-65, 2016.

PINTÃO AM; Silva IF. A Verdade sobre o açafrão, In:Workshop Plantas Medicinais e Fitoterapêuticas nos Trópicos. IICT /CCCM; 2008:1-19, Out, 29-31.

SALGADO-CRUZ, M. d; CEDILLO-LÓPEZ, D.; BELTRÁN-OROZCO, M. Estudio de las propiedades funcionales de la semilla de chía (Salvia hispánica) y de la fibra dietaria obtenida de la misma. In: **Resumenes Extendidos del VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y III Tercer Foro de Ciencia y Tecnologia de Alimentos**. 2005.

TREMAROLI, V.; BACKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature,** v. 489, p. 242-249, 2012.

VOSOUGHKIA M, Hossainchi G, Ghavami M, Gharachorloo M, Delkhosh. Evaluation of oil content and fatty acid composition in seeds of different genotypes of safflower (Carthamustinctorius L.). **Int J Agric Scient Res**. 2011;2(1):59-66