



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO- DOIS IRMÃOS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**  
**CURSO LICENCIATURA PLENA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DE ENTEROCINAS OBTIDAS POR *E. Faecium***  
**137v E 141v PARA CONTROLE DO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER**  
**COLORRETAL ACOMPANHADO POR ULTRASSONOGRRAFIA**

**ANA BEATRIZ LINS ARAGÃO**

**RECIFE**

**2020**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO-UFRPE**

**ANA BEATRIZ LINS ARAGÃO**

**ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DE ENTEROCINAS OBTIDAS POR *E. Faecium*  
137v E 141v PARA CONTROLE DO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER  
COLORRETAL ACOMPANHADO POR ULTRASSONOGRRAFIA**

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) para obtenção do grau de licenciatura plena em Ciências Biológicas.

Orientadora: Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

Coorientadora: Priscilla Régia de Andrade Calaça

**RECIFE**

**2020**

**ANA BEATRIZ LINS ARAGÃO**

**ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DE ENTEROCINAS OBTIDAS POR *E. Faecium*  
137v E 141v PARA CONTROLE DO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER  
COLORRETAL ACOMPANHADO POR ULTRASSONOGRAFIA**

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) para obtenção do grau de licenciatura plena em Ciências Biológicas.

Local \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Elayne Cristine Soares da Silva  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup> Ms<sup>o</sup> Elaine Cristina da Silva  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

A532e Aragão, Ana Beatriz Lins  
ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DE ENTEROCINAS OBTIDAS POR E. Faecium 137v E 141v PARA  
CONTROLE DO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER COLORRETAL ACOMPANHADO POR  
ULTRASSONOGRAFIA / Ana Beatriz Lins Aragão. - 2020.  
48 f. : il.

Orientadora: Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares.  
Coorientadora: Priscilla Regia de Andrade Calaca.  
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Licenciatura em Ciências Biológicas, Recife, 2020.

1. Bactérias ácido lácticas. 2. Câncer colorretal. 3. Enterocinas. I. Soares, Maria Taciana Cavalcanti  
Vieira, orient. II. Calaca, Priscilla Regia de Andrade, coorient. III. Título

---

CDD 574

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pela sua grandeza e amor, também a toda minha família pelo apoio e força que sempre me deram, a todos os meus companheiros de laboratório, em especial Priscilla Calaça, Dayane Santos e Janaína Ferreira que estiveram comigo em todo no desenvolvimento deste trabalho. A professora Maria Taciana por acreditar em meu potencial e me dar a oportunidade de crescer profissionalmente e também como ser humano. Também agradeço aos meus amigos e companheiros de graduação por todas as alegrias e momentos vividos ao longo dessa jornada.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPQ, ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação-PIBITI, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e a Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE.

## SUMÁRIO

<b>1. LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>6</b>
<b>2. LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>3. LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>9</b>
<b>4. RESUMO GERAL.....</b>	<b>10</b>
<b>5. CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>11</b>
5.1 Bactérias ácido lácticas .....	12
5.2 O gênero Enterococcus .....	14
5.3 Bacteriocinas .....	15
5.3.1 Classificação das bacteriocinas.....	17
5.3.2 Produção das bacteriocinas .....	19
5.3.3 Mecanismo de ação das bacteriocinas.....	19
5.4 Enterocinas.....	20
5.5 Câncer colorretal.....	22
5.5.1 Fatores de Risco .....	23
5.5.2 Diagnóstico.....	24
5.5.3 Prevenção e tratamento .....	24
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>26</b>
<b>7. CAPÍTULO II: AS ENTEROCINAS PREVINEM O CÂNCER COLORRETAL?     UMA ANÁLISE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>32</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>33</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>33</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>34</b>
<b>7.1 Introdução .....</b>	<b>35</b>
<b>7.2 Material e métodos .....</b>	<b>36</b>
7.2.1 Micro-organismo.....	36
7.2.2 Isolamento das enterocinas.....	37
7.2.3 Caracterização das enterocinas .....	37
7.2.3.1 Sensibilidade à protease .....	37
7.2.3.2 Determinação da atividade antimicrobiana.....	37
7.2.4 Desenho experimental.....	38
7.2.4.1 Animais e dieta .....	38
7.2.4.2 Delineamento experimental.....	39
7.2.5 Ultrassonografia abdominal para avaliação do efeito das enterocinas sobre o câncer colorretal .....	40
<b>7.3 Resultados .....</b>	<b>40</b>
7.3.1 Caracterização das enterocinas quanto ao seu perfil proteico .....	40
7.3.2 Caracterização das enterocinas quando a sua função biológica.....	41
7.3.3 Efeito das enterocinas aplicadas sobre o câncer colorretal.....	41
<b>7.4 Discussão.....</b>	<b>43</b>
<b>7.5 Considerações finais.....</b>	<b>45</b>
<b>7.6 Agradecimentos.....</b>	<b>45</b>
<b>7.7 Referências .....</b>	<b>45</b>

## 1. LISTA DE ABREVIATURAS

**ACF** - Aberrant crypt foci

**ARGs** - Antibiotic resistance genes

**ATCC** – American type culture collection

**ATP** – Adenosine Triphosphate

**BAL** – Bactéria ácido láctica

**CAPES** - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**CCR** – Câncer Colorretal

**CENAPESQ** – Centro de apoio à pesquisa da UFRPE

**CEUA** – Comissão de ética no uso de animais

**CMI** – Concentração mínima inibitória

**CNPQ** – Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico

**DMH** – 1,2 DimetilHidrazina

**D.O** – Densidade Óptica

**FAP** – Familiar adenomatous polyposis

**HNPCC** – Hereditary non polyposis colorectal câncer

**INCA** – Instituto Nacional de Câncer

**JPS** – Juvenile polyposis syndrome

**LABTECBIO** – Laboratório de tecnologia de bioativos

**MAP** – MYH- associated polyposes

**MGEs** - Mobile genetic elements

**MRS** – Man, Rogosa e Shape

**PHTS** – PTEN Hamartoma tumor syndrome

**PIBITI** – Programa Institucional de bolsas de iniciação em desenvolvimento tecnológico e inovação

**PJF** – Peutz- Jeghers syndrome

**PMF** – Proton motor force

**Sec** – Via de secreção geral

**SISGEN** – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

**UA** – Unidade arbitrária

**UFC** – Unidades formadoras de colônias

**UFRPE** – Universidade Federal Rural de Pernambuco



## 2. LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Mecanismo de ação das bacteriocinas produzidas pelas bactérias ácido láticas (OGAKI,2015)

**Figura 2.** Atividade inibitória do crescimento da bacteriocina enterocina- B e combinação de bacteriocinas (heterodímero de enterocina-A + B) contra várias células cancerosas humanas

### ARTIGO

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

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

### 3. LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Diferenças entre as bacteriocinas e os antibióticos (CLEVELAND, 2001)

**Tabela 2.** Modelo de classificação de bacteriocinas (COLLIN,2005)

#### ARTIGO

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

**Tabela 2.** Atividade antimicrobiana das enterocinas E141v e 137v isoladas a partir de *enterococcus faecium* oriundas de queijo de coalho artesanal em condições variadas determinadas pelo método de diluição crítica

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

#### 4. RESUMO GERAL

O queijo de coalho artesanal é um alimento muito presente no Brasil, tendo uma microbiota bem complexa e em sua grande maioria estão as bactérias ácido lácticas (BAL), microrganismos bastante conhecidos por estarem presentes em produtos lácteos os mais diversos, e também por serem, em muitos casos, probióticos, e como tal são capazes de sintetizar diversos compostos que auxiliam no bom funcionamento do organismo, como por exemplo as bacteriocinas, peptídeos com atividade antimicrobiana sob determinadas condições. Dentre os principais gêneros de BAL está o *Enterococcus*, as bacteriocinas produzidas pelas bactérias desse gênero são chamadas de enterocinas. Estudos tem demonstrado o potencial anticâncer, tanto na prevenção como no retardo do desenvolvimento, dessas bactérias, e provavelmente está relacionado a esses peptídeos. O objetivo deste estudo foi avaliar a aplicação e viabilidade das enterocinas produzidas pelas bactérias ácido láctica *Enterococcus faecium* 137V e 141V, oriundas de queijo de coalho artesanal produzido em Pernambuco, a fim de comprovar a sua eficácia no retardo do desenvolvimento do câncer colorretal induzido. A metodologia consistiu em caracterizar as bacteriocinas quanto ao seu perfil peptídico e também suas propriedades antimicrobianas. A ultrassonografia foi utilizada para avaliar o efeito das enterocinas sobre o câncer colorretal desenvolvido em ratos Wistar. Os resultados obtidos nos testes que envolveram a sensibilidade a protease, foi possível observar um decréscimo na atividade antimicrobiana das enterocinas, quando submetida a pepsina o que sugere a natureza peptídica das mesmas. Os experimentos *in vitro* demonstraram a eficácia das enterocinas quanto a sua atividade antimicrobiana, pois elas apresentaram um espectro de ação amplo envolvendo bactérias patogênicas Gram positivas e Gram negativas. Quanto aos resultados da ultrassonografia, foi possível observar uma diminuição da espessura da parede intestinal dos ratos que foram submetidos a indução do câncer colorretal e tratados com as enterocinas, o que sugere a estimulação da apoptose, visando inibir o crescimento e desenvolvimento das células cancerígenas. Sendo assim, os resultados obtidos nesse trabalho sinalizaram a importância da utilização das enterocinas como suplementação promissora no processo de prevenção e tratamento do câncer colorretal.

Palavras-chave: Bactérias ácido lácticas, câncer colorretal, enterocina

**5. CAPÍTULO I:  
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

## 5.1 Bactérias Ácido Lácticas

As bactérias do ácido lácticas (BAL) compreendem uma grande variedade de gêneros, incluindo um número significativo de espécies. São bactérias gram-positivas e geralmente catalase-negativas, crescendo sob condições microaerofílicas ou estritamente anaeróbicas e não são formadoras de esporos (KLEIN et al., 1998). Os principais gêneros que representam as BAL são: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, entre outros (DAS et. al., 2019).

As BAL são classificadas de acordo com a sua morfologia celular que é bem diversa, podendo apresentar-se em forma de bastonete ou cóccica, em células isoladas ou em casal, tétrades e cadeias curtas ou longas (SETTANNI, MOSCHETTI, 2010) e pela via de fermentação utilizadas para fermentar a glicose, sendo agrupadas em homofermentativas, referente as que produzem ácido láctico como metabólito principal da fermentação da glicose, e heterofermentativas, referente as que produzem etanol, dióxido de carbono e outros compostos além do ácido láctico (RIVERA-ESPINOZA, GALLARDO-NAVARRO, 2010).

As BAL podem, ainda, ser classificadas de acordo com a temperatura de crescimento em mesofílicas e termofílicas. As primeiras tem o crescimento a uma temperatura ótima por volta de 30 °C, já as segundas tem o crescimento a uma temperatura ótima de 42 °C (FOX et. al.,2000).

As bactérias ácido lácticas podem ser o grupo mais numeroso de bactérias ligadas aos seres humanos. Elas estão naturalmente associadas às superfícies mucosas, principalmente do trato gastrointestinal, e também, estão habitualmente relacionadas com a produtos fermentados incluídos na alimentação (MAKAROVA, KOONIN, 2007).

Essas bactérias são encontradas em diversas aplicações industriais, graças a algumas das propriedades metabólicas que apresentam, contribuindo significativamente para o sabor, textura, valor nutricional e até mesmo segurança microbiana de alimentos fermentados (SETTANNI, MOSCHETTI,2010).

O emprego de BAL, na forma de fermento láctico, para elaboração de produtos lácteos fermentados é muito conhecido, principalmente na fabricação de leite

acidificado, iogurte e queijos. No entanto, elas também são usadas no processamento de carnes, bebidas alcoólicas e vegetais (BRUNO, CARVALHO, 2009).

O estudo de Silva et al. (2012) – que avaliou a diversidade bacteriana presente no queijo de coalho artesanal de Pernambuco, verificaram que os principais gêneros de bactérias ácido lácticas estavam presentes e formavam uma comunidade estrategicamente organizada nesse produto.

Certas cepas de BAL, estão cada vez mais sendo comercializadas, e caracterizadas como probióticos (SAVIJOKI, INGMER, VARMANEN, 2006), 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). Sendo assim, as BAL probióticas produzem alguns compostos que executam papel importante na manutenção da homeostase, como aminoácidos, vitaminas, ácidos graxos de cadeia curta, enzimas e substâncias multifuncionais denominadas de bacteriocinas (MIKKILI *et. al.*, 2018).

Além disso, estudos demonstram que elas também desempenham atividade anticancerígena, podendo ser explicada principalmente por sua interação com a membrana alvo, sendo conhecidas por serem “ativos de membrana”, especialmente as bacteriocinas com carga positiva pois se ligam a membrana negativa das células cancerígenas (BAINDARA, KORPOLE, GROVER, 2018; DRIDER *et. al.*, 2016).

Sendo assim, as Bactérias Ácido Lácticas, podem ser úteis para os seres humanos e animais, em muitos aspectos que incluem prevenção de diarreia, estímulo da imunidade, tanto a nível intestinal e sistêmico, papel na prevenção de doenças infecciosas, bem como nos efeitos sobre a incidência de câncer de cólon e no retardo da progressão do câncer (MASOOD *et. al.*, 2011; CALAÇA *et. al.*, 2017). Como por exemplo, no trabalho de Jaskulski *et. al.* (2020), obtiveram resultados positivos demonstrando o potencial de estabilização do CCR em grupos de ratos Wistar induzidos com 1,2-dimetil-hidrazina (DMH) e tratados com *Lactobacillus lactis*. Cada animal dos grupos de tratamento recebeu 1 mL da suspensão bacteriana por gavagem, uma vez ao dia, durante seis semanas, quanto aos resultados da avaliação dos parâmetros hematopatológicos, o grupo que manteve a dieta padrão e foi administrado com DMH e o *L. lactis*, apresentou valores elevados de células de defesa

o que sugeriu uma resposta imune promissora sobre o desenvolvimento do câncer colorretal.

## 5.2 O gênero *Enterococcus*

*Enterococcus* spp. são um gênero de bactérias ácido lácticas capazes de crescer e sobreviver em condições adversas. Eles são onipresentes, ou seja são encontrados em ambientes diversos na natureza, estando presente no solo, na água, em associação com plantas, em produtos fermentados e compondo parte da microbiota intestinal de vertebrados e invertebrados (RIBOLD *et. al.* 2009; GARCIA-SOLACHE, MONICA, RICE, 2019).

Os microrganismos do gênero *Enterococcus* foram descritos pela primeira vez por Thiercelin, sendo assim classificados como pertencentes ao grupo de estreptococos, descrito por Sherman, contudo teve sua classificação modificada após a realização de estudos bioquímicos, genéticos e imunológicos, indicando que eles deveriam ser separados do até então gênero *Streptococcus*. Dessa forma, o novo gênero *Enterococcus* foi oficialmente estabelecido por Schleifer e Kilpper-Balz, 1984 (ALBUQUERQUE, 2014)

Geralmente, os enterococos crescem otimamente a uma temperatura de 35 ° C, embora as espécies possam variar a fase de crescimento em temperaturas de 10 a 45 ° C. Eles também podem ser resistentes, crescendo na presença de grandes concentrações de NaCl a 6,5%, e de pH a 9,6 (FOULQUIÉ-MORENO *et. al.*, 2016)

Atualmente esse gênero apresenta mais de 20 espécies, destacando-se, principalmente, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* que dependendo de sua origem, podem ser caracterizados como microrganismos patogênicos ou probióticos (HUNG *et. al.*, 2019; SANTOS *et. al.*, 2019). Inicialmente, a presença desse gênero em produtos lácteos era considerada como indicador de condições sanitárias inapropriadas durante a produção e o processamento dos produtos lácteos, todavia, evidências científicas, tem proporcionado um aumento no interesse que se deve em grande parte à sua utilização como probióticos efetivos (BRANDALIZE, 2013).

Estudos “*in vitro*” realizados por Yerlikaya e Akbulut (2020) que tiveram como objetivo investigar o potencial probiótico de cepas de enterococos, dentre elas *E.*

*faecium* isoladas de leite cru e de produtos lácteos tradicionais, verificaram através de diversos experimentos que envolviam atividade antimicrobiana, resistência à vancomicina, resistência ao pH (ambiente ácido), crescimento na presença de sal biliar, desconjugação do sal de bile e hidrofobicidade que as cepas desse gênero tem potencial para serem utilizadas como probióticos, uma vez que foram capazes de sobreviver as condições as quais foram submetidas.

Além disso, Santos *et. al.* 2020, realizaram um estudo com base na comparação da mobilidade genética de microrganismos, visando diferenciar patogênicos e dos probióticos e informar o uso seguro dos últimos. Foi verificado que diferenças no número de elementos genéticos móveis ( MGEs) foram encontradas nos genes de resistência a antibióticos (ARGs), na presença e ausência dos genes que diferenciam geneticamente os probióticos de *E. faecium* e as bactérias patogênicas o que sugere que a mobilidade genética pode ser eficaz na diferenciação dos microrganismos probióticos e patogênicos.

A distribuição dos enterococos em diversos nichos demonstra seu potencial de adaptação bem como de crescimento em diversas condições ambientais, inclusive em alimentos. Sendo assim, podem contribuir para o desenvolvimento de aroma e sabor em produtos lácteos, cárneos e vegetais fermentados também produzem metabólitos de origem peptídica, as bacteriocinas, no caso deste gênero, essas últimas são denominadas de enterocinas (TORMEN,2016; FRANZ *et. al.*, 2007).

### **5.3 Bacteriocinas**

O termo bacteriocina foi originalmente utilizado para descrever o tipo de colicina de *Escherichia coli* de proteínas antimicrobianas. Hoje, no entanto, este termo é usado para definir um grupo muito maior de compostos antimicrobianos (NES, JOHNSBORG, 2004).

São bacteriocinas, portanto, as nisinas, pediocinas, lactocinas, lactococinas, leuconocinas, plantaricinas, carnobacteriocinas, enterocinas, entre outras. No geral, são catiônicas e demonstram propriedades anfipáticas, tendo como alvo de sua atividade, na maioria das vezes, a membrana da bactéria. Podem ser produzidas tanto por bactérias Gram-positivas como por bactérias Gram-negativas (OGAKI, FURLANETO, MAIA, 2015).



Essas substâncias são de origem proteica e variam em termos de tamanho, alvos microbianos, modos de ação e mecanismos de imunidade. Apesar de desempenharem atividade antimicrobiana, diferem dos antibióticos tradicionais (tabela 1), pois têm um espectro de inibição relativamente estreito e são apenas tóxicas para bactérias intimamente relacionadas com a cepa produtora (CLEVELAND, 2001). Estas toxinas foram encontradas em todas as principais linhagens de bactérias, e dentro de uma espécie dezenas ou mesmo centenas de diferentes tipos de bacteriocinas são produzidos (RILEY, WERTZ, 2002).

Tabela 1. Diferenças entre as bacteriocinas e os antibióticos

<b>Característica</b>	<b>Bacteriocinas</b>	<b>Antibióticos</b>
<b>Aplicação</b>	Alimentos	Clínico
<b>Síntese</b>	Ribossomal	Metabolito secundário
<b>Atividade</b>	Espectro estreito (pequeno)	Espectro Variado
<b>Imunidade a célula hospedeira</b>	Sim	Não
<b>Mecanismo de resistência ou tolerância da célula-alvo</b>	Afeta a membrana da celular	Depende do modo de ação
<b>Requisitos de interação</b>	Moléculas de acoplamento	Alvo específico
<b>Modo de ação</b>	Formação de poros, geralmente	Membrana celular ou alvos intracelulares
<b>Efeitos colaterais da toxicidade</b>	Nenhum conhecido	Sim

Adaptada de CLEVELAND et. al., 2001

Além disso, são ribossomicamente sintetizadas e produzidas durante a fase primária de crescimento microbiano, enquanto que os antibióticos são metabólitos secundários (ALBUQUERQUE, 2014).

As bacteriocinas são um grupo heterogêneo, selecionado, principalmente para avaliação e uso como antagonistas específicos contra bactérias patogênicas; contudo,

outras funções como sua utilização em alimentos tem sido alvo de debates. No entanto, sua eficácia nesse meio pode ser limitada por várias razões, e o custo continua sendo um problema que impede o uso mais amplo de bacteriocinas como aditivos alimentares (CHEN, HOOVER, 2003).

### 5.3.1 Classificação das bacteriocinas

Ainda há muitos debates em relação a classificação das bacteriocinas, muitas foram as abordagens utilizadas para agrupá-las. As bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas, por exemplo, já passaram por diversas formas de classificação.

Klaenhammer (1993) organizou as bacteriocinas produzidas por BAL, em quatro classes distintas. Sendo que a Classe I está relacionada aos lantibióticos, um grupo de pequenos peptídeos, como peso molecular bastante baixo (< 5 kDa), possuindo a presença de lantionina e outros aminoácidos. Um exemplo de representante dessa classe é a nisina. Já Classe II também é relacionada a pequenos peptídeos, com baixo peso molecular (< 10 kDa). Segundo o autor, essa classe apresenta subdivisões IIa, IIb e IIc. A Classe III engloba peptídeos termolábeis de alto peso molecular, se comparada as outras duas classes, (> 30 kDa) e, por fim, a Classe IV compreendem grandes bacteriocinas unidas a carboidratos ou lipídios.

Cotter, Hill e Ross (2005), sugeriram outra classificação, desta vez com três classes. Classe I referente aos lantibióticos, classe II referente as bacteriocinas que não contêm lantionina, subdividindo-se em IIa, IIb, IIc e IId, e a Classe III referente as bacteriolisinas. Conforme mostra a tabela 2.

Tabela 2. Modelo de classificação de bacteriocinas proposta por COLLIN, HILL, ROSS, 2005

Classificação	Sugestões	Exemplos
<b>Classe I</b>		
<b>Bacteriocinas que contém lantionina</b>	Incluem tanto um único quanto dois peptídeos lantibióticos; Até 11 subclasses foram propostas.	Péptideo único: nisina, mersacidina, lacticina 481; dois-peptídeo: lacticina 3147, citolisina
<b>Classe II</b>		

<b>Bacteriocinas que não contém lantionina</b>	Classe heterogênea de pequenos peptídeos; inclui:  O tipo pediocina (subclasse de bacteriocinas)  Dois peptídeos (bacteriocinas subclasse b), Cíclico (subclasse c; anteriormente classe V),  Não pediocina peptídeos lineares únicos (subclasse d)	Classe IIa: pediocina PA1,  Classe IIb: leucocina A, lactacina F  Classe IIc: enterocina AS48, reuterina 6  Classe IId: lactococcina A, divergicina A
<b>Bacteriolisinas</b>		
<b>Proteínas líticas ( não bacteriocinas)</b>	Proteínas grandes e termolábeis, geralmente hidrolases de mureína	Lisostafina, enterolisina A

Adaptada de COLLIN, HILL, ROSS, 2005.

Contudo, posteriormente a essa classificação, outras maneiras de classificar as bacteriocinas foram sendo apontadas. Desta forma, Cotter, Hill e Ross (2013), considerando todas as divergências nas classificações, propuseram uma nova classificação para as bacteriocinas, que consiste na separação das bacteriocinas produzidas por bactérias gram-positivas e das produzidas por bactérias gram-negativas.

**Bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas:** Apresentam duas classes (I e II), sendo que III teria sido incluída em uma subdivisão da classe II. A Classe I, engloba os peptídeos que sofrem modificação pós-traducionais, já a classe II, os peptídeos que não são amplamente modificados ou que sofrem modificação modesta, como formação de pontes dissulfureto, circularização ou adição de N - formilmetionina.

**Bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-negativas:** Podem ser divididas em pequenos peptídeos, como microcinas, e proteínas um pouco maiores, como colicinas. As

microcinas são previamente divididas com base na presença (classe I) ou ausência (classe II) de modificação significativa.

Yang *et. al.* (2014), utilizaram classificação semelhante em seu estudo, baseada na divisão entre bacteriocinas produzidas por bactérias gram-positivas e gram-negativas, adotando novamente a classe III para as primeiras.

### **5.3.2 Produção das bacteriocinas**

A produção de bacteriocinas ocorre em todas as fases de crescimento da bactéria produtora e cessa no final da fase exponencial. Sua indução muitas vezes ocorre em condições de estresse, como o aumento populacional e a escassez de nutrientes, podendo ser afetada pelo tipo de fonte de carbono, nitrogênio e fosfato presentes no meio, ou até mesmo por cátions surfactantes e outros inibidores (OGAKI, FURLANETO, MAIA, 2015).

As bacteriocinas, geralmente são sintetizadas como um pré-peptídeo inativo que inclui uma sequência líder N-terminal. Posteriormente, os pré-peptídeos são transportados para a superfície da célula durante a fase de crescimento exponencial e por meio de enzimas são convertidos em suas formas ativas. Dessa maneira, é a sequência líder que supostamente mantém a forma inativa do pré-peptídeo dentro da célula produtora, auxilia e facilita a interação com o transportador e, no caso dos lantibióticos, possivelmente tem um papel no reconhecimento pelo mecanismo de modificação. Este líder é, na maioria das vezes, clivado durante a exportação por um sistema dedicado de transporte de bacteriocina ou, com menos frequência, pela via de secreção geral (Sec) da própria célula (COTTER, HILL, ROSS, 2005; BALCIUNAS *et. al.*; 2013).

### **5.3.3 Mecanismo de ação das bacteriocinas**

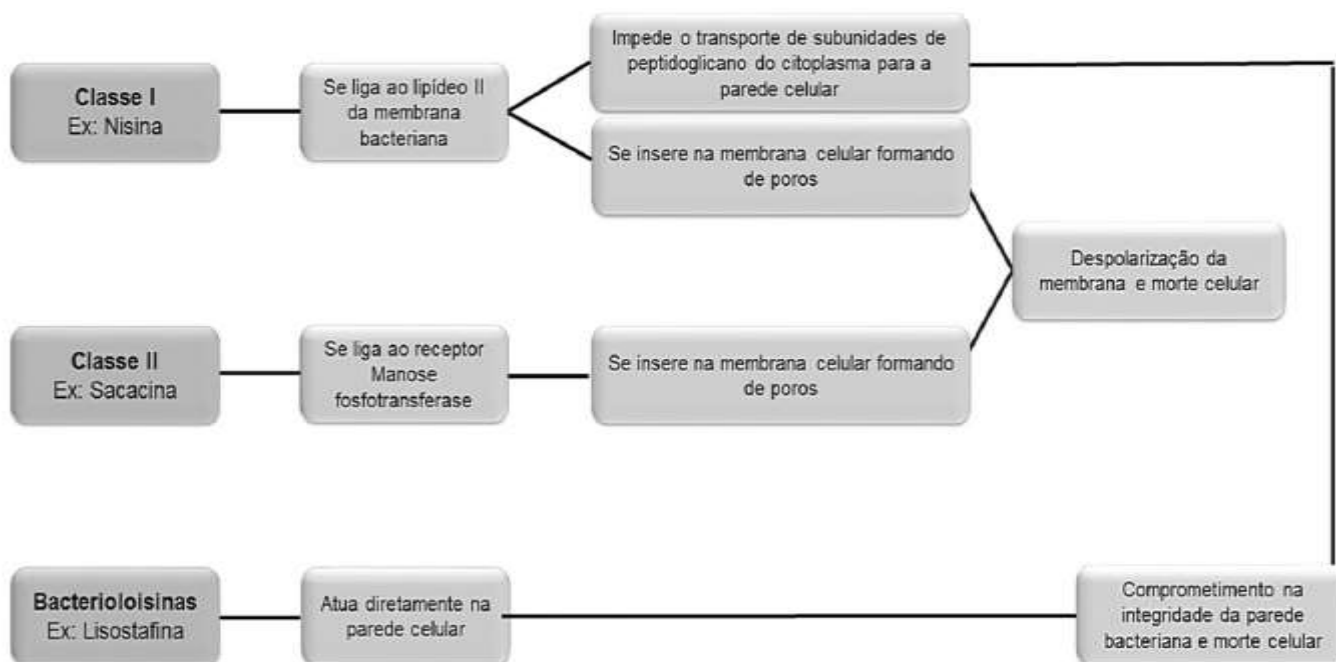
Sabe-se que as bacteriocinas apresentam diversos mecanismos de ação que são diferentes dos antibióticos propriamente ditos. Grande parte das bacteriocinas que tem o modo de ação associado a membrana celular, age estimulando a formação de poros na membrana, resultando na perda da força próton motora (PMF), que está envolvida em diversos processos na membrana citoplasmática, como por exemplo, a síntese de ATP.

As nisinas e outras bacteriocinas da classe I, e algumas da classe II têm como alvo o lipídeo II que é um intermediário fundamental no processo de biossíntese do peptidoglicano dentro do envelope da célula bacteriana assim como é o alvo do antibiótico vancomicina. Além disso, grande parte desses peptídeos ligam-se ao lipídeo II em um local diferente ao da vancomicina, e por essa razão apresentam atividade contra patógenos gram-positivos resistentes a esse antibiótico (OGAKI, FURLANETO, MAIA, 2015; COTTER, HILL, ROSS, 2013).

As bacteriocinas da classe II, também induzem a permeabilização da membrana celular alvo, provavelmente formando poros que, resultam na dissipação da PMF e o esgotamento do ATP intracelular (DRIDER *et. al.* 2006)

Já a classe III, tem o mecanismo de ação diferente das classes I e II, pois atuam na parede celular, resultando na lise da célula da bacteriana (COTTER, HILL, ROSS, 2005), como mostra a figura 1 e 2.

Figura 1. Mecanismo de ação das bacteriocinas produzidas pelas bactérias ácido lácticas



Fonte: OGAKI, FURLANETO, MAIA, 2015

#### 5.4 Enterocinas

As BAL do gênero *Enterococcus* produzem bacteriocinas, chamadas Enterocinas. Estas, por sua vez, apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas e geralmente de origem alimentar (FRANZ *et. al.*, 2007).

Por essa razão, as enterocinas tem despertado um grande interesse comercial no que diz respeito a sua utilização como conservantes de alimento, sendo conhecidas por exibir espectro inibitório para diversos patógenos de origem alimentar, tendo como exemplo *Listeria spp.* e *Clostridium spp.* (BHARDWAJ, MALIK, CHAUHAN, 2008).

De acordo com Franz *et. al.* (2007) as enterocinas são classificadas seguindo a proposta de Klaenhammer, tendo as classes I, II, III e IV de bacteriocinas, abrangendo desde os peptídeos de baixo peso molecular até grandes proteínas como enterolisina. Contudo, grande parte pertence as bacteriocinas da classe II, sendo pequenas, não antibióticos, estáveis ao calor e com um efeito antilisterial geralmente forte (GIRAFFA, 2003).

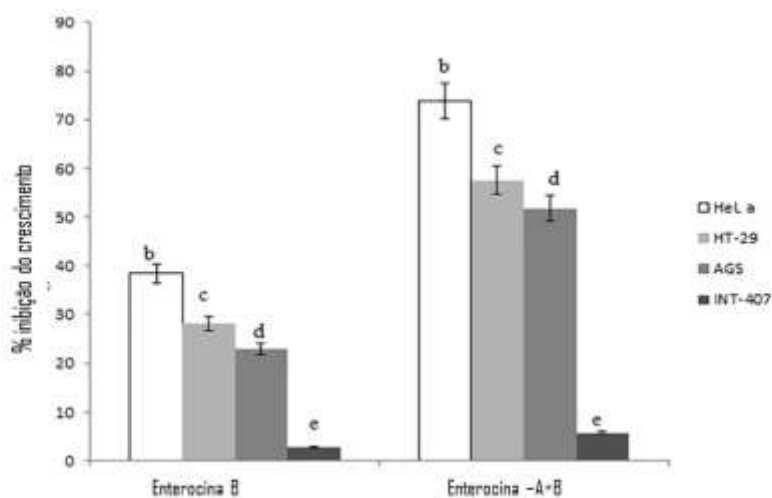
Portanto, como a maioria das bacteriocinas, essas substâncias produzidas por enterococcus têm o citoplasma membrana como seu alvo principal, estimulando a formação de poros, esgotando assim o potencial transmembrana e /ou o gradiente de pH, resultando no vazamento de indispensáveis moléculas intracelulares (MORENO *et. al.*, 2006).

Grande parte das enterocinas produzidas são originadas das principais espécies de enterococos, *E. faecalis* e *E. faecium* (GIRAFFA, 2003), muitos estudos têm sido realizados, visando isolar essas substancias antimicrobianas a partir de várias fontes.

Além da sua utilização como conservantes de alimentos, estudos tem sugerido a sua participação no processo de tratamento de doenças, como por exemplo o câncer. Isso porque, as células malignas apresentam certas diferenças em relação as normais, e esses peptídeos são catiônicos por natureza, se ligando a membrana da célula cancerígena, que possui um potencial negativo o que contribui para atividade citotóxica seletiva dos peptídeos (HOSKIN, RAMAMOORTHY, 2008)

Ankaiah *et. al.* 2018, verificaram *in vitro* o potencial de inibição de enterocinas (enterocina-B) em linhagens de células cancerígenas, como HeLa, HT-29 e AGS. Além disso, obtiveram um aumento significativo na inibição dessas células cancerígenas quando foram tratadas com uma combinação de bacteriocinas (enterocinas -A + B), conforme mostra a figura 2.

Figura 2. Atividade inibitória do crescimento da bacteriocina enterocina-B e combinação de bacteriocinas (heterodímero de enterocina-A + B) contra várias células cancerosas humanas.



Fonte: ANKAIAH *et. al*, 2018

## 5.5 Câncer colorretal

O câncer colorretal (CCR) ocorre quando as células que revestem o cólon ou reto tornam-se anormais e crescem fora de controle (NOROUZI *et. al.*, 2018). Ele é uma das principais causas de morte por câncer em homens e mulheres (KUMAR *et. al*, 2011), sendo 3º 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).

A maioria dos CCR surgem a partir de pólipos adenomatosos inicialmente benignos, após alguns anos eventualmente podem se tornar cancerosos, formando tumores na parede do reto ou cólon (adenocarcinomas), caso não detectados logo, crescem em vasos sanguíneos ou vasos linfáticos, aumentando a chance de metástases para outros sítios anatômicos (SILVA, ERRANTE, 2016; MARLEY, NAN, 2016)

Sabe-se que o trato gastrointestinal é colonizado com microrganismos logo após o nascimento e permanece como lar para uma população diversificada de organismos ao longo da vida do hospedeiro, mantendo-se relativamente estável. Todavia, alguns fatores podem romper o equilíbrio da microbiota intestinal,

influenciando no aparecimento do câncer colorretal, sendo possível admitir que mudar a microbiota intestinal poderia influenciar o desenvolvimento do tumor (SANTOS *et. al.*, 2011; KUMAR *et. al.*, 2011; FIGLIUOLO, COUTINHO-SILVA, COUTINHO, 2018).

### 5.5.1 Fatores de risco

Os fatores de risco para o CCR podem estar associados tanto a questões ambientais quanto genéticas (MARLEY; NAN, 2016). Segundo American Cancer Society (2019), mais da metade dos cânceres colorretais são associados a fatores de risco modificáveis, como a obesidade e sedentarismo, tabagismo, consumo de álcool, fatores relacionados à dieta, tais quais o alto consumo de carne vermelha ou processada e alimentos pobres em fibras, entre outros.

O consumo de carne vermelha bem como suplementação de ferro heme têm demonstrado um aumento na concentração fecal de compostos nitrosos, estes são agentes alcalinos capazes de reagir com o DNA dos tecidos alvos para alterar suas bases e pode, potencialmente iniciar a carcinogênese (ZANDONAI, SONOBE, SAWADA, 2012)

Assim, até 75% dos casos estão associados com os hábitos alimentares, indicando que uma pessoa pode reduzir o seu risco simplesmente através de uma modificação na dieta (CHEN *et. al.*, 2012), dessa forma, a dieta pode desempenhar um papel adverso ou protetor no desenvolvimento de CCR (RAWLA, SANKARA, BARSOUK, 2019).

Entre os fatores não modificáveis estão idade, doença inflamatória intestinal e história familiar de câncer colorretal ou hereditariedade (JOHNSON *et. al.*, 2013). Em relação a este último, acredita-se que são responsáveis por 7-10% de todos os casos, sendo assim, indivíduos que têm parentes biológicos com história de câncer colorretal ou adenoma colorretal apresentam risco elevado de desenvolver a doença. Contudo, o nível de risco depende do grau de parentesco sendo maior em parentes de primeiro grau, da idade em que a pessoa índice foi diagnosticada com câncer colorretal e do número de parentes afetados (KOLLIGS, 2016).

Além disso os fatores hereditários incluem as síndromes de polipose adenomatosa (FAP e MAP), hamartomatosa (PJS, JPS, PHTS) e o câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC) (RAWLA, SANKARA, BARSOUK, 2019). No câncer colorretal não polipoide a doença, desenvolve-se rapidamente, sendo



precedida por poucos ou nenhum pólipos, e tende a ocorrer em indivíduos mais jovens (SILVA, ERRANTE, 2016)

### **5.5.2 Diagnóstico**

O rastreamento tem como objetivo diagnosticar mais pólipos ou lesões planas, e reduzir a mortalidade causada pelo câncer colorretal (SILVA, ERRANTE, 2016). Existem métodos não invasivos e métodos um pouco mais invasivos de diagnóstico do câncer colorretal.

O teste de sangue oculto nas fezes, por exemplo, representa um método não invasivo, simples e barato que analisa a presença de hemoglobina nas fezes, importante indicador de sangramento do trato gastrointestinal (ŚWIDERSKA *et. al.*, 2014), contudo esse teste pode não ser totalmente eficiente, uma vez que a presença de sangue nas fezes representa um indicador inespecífico de CCR, podendo apresentar resultados falsos-negativos ou falsos-positivos (SILVA, ERRANTE, 2016). No entanto, o teste pode despertar um alerta para a realização de mais exames, afim de detectar a presença do CCR.

O método mais comumente aplicado e mais eficiente no diagnóstico do CCR é a endoscopia que envolve a sigmoidoscopia e colonoscopia. Esses exames permitem localizar o tumor e retirar parte do intestino grosso para análise histológica. A sigmoidoscopia permite ver apenas a parte inferior do cólon e do reto, já a colonoscopia permite obter uma imagem do todo, ambos os exames possuem sensibilidade e especificidade semelhantes (ŚWIDERSKA *et. al.*, 2014).

Também, se supõe, que os Focos de Criptas Aberrantes (ACF), ou pelo menos alguns deles, podem ser precursores desse tipo de câncer (CALAÇA *et al.*, 2017), sendo possível diagnosticá-lo através da verificação de pequenas lesões nas criptas intestinais (MAIA, FIORIO, SILVA, 2018).

### **5.5.3 Prevenção e tratamento**

O CCR comumente se desenvolve lentamente ao longo de muitos anos, logo, essa doença pode ser prevenida se os adenomas forem detectados e removidos antes que progridam para o câncer. Além disso, o câncer colorretal é geralmente curável se detectado em estágios iniciais. Por isso, o rastreamento e a detecção precoce são medidas excelentes para a prevenção (KOLLIGS, 2016).

Entre as estratégias adotadas para reduzir a incidência e até mesmo a mortalidade CCR estão as de prevenção primária, que envolvem mudanças na dieta ou aumento da atividade física, e estratégias de prevenção secundárias, como a triagem (JOHNSON *et al.*, 2013).

Indivíduos de baixo risco, a partir de 50 anos de idade devem realizar anualmente pesquisa de sangue oculto nas fezes e retossigmoidoscopia a cada cinco anos. A partir dos 60 anos de idade, colonoscopia ou enema opaco a cada 10 anos (SILVA, ERRANTE, 2016)

Dentre as principais formas de tratamento estão a cirurgia (biopsia), a quimioterapia e a radioterapia (MEDEIROS *et. al.*, 2018), contudo estes procedimentos são considerados bastante invasivos para o indivíduo. Estudos tem demonstrado a importância da utilização dos microrganismos probióticos como coadjuvantes tanto no tratamento quanto no processo de prevenção do CCR.

Sendo assim, o CCR pode ser prevenido por probióticos através de possíveis mecanismos que incluem a diminuição do pH no intestino, a modulação das enzimas produzidas por bactérias patogênicas (tais como  $\beta$ -glucosidase e glucuronidase, que convertem os pró-carcinógenos em cancerígenos), a redução na expressão de oncoproteínas e a produção de butirato de sódio através da fermentação de lactose, que é um potente inibidor de crescimento e um indutor da diferenciação fenotípica e apoptose (ASHA, GAYATHRY, 2012).

Uma compreensão mais sólida do padrão de desenvolvimento do CCR, dos fatores de risco ambientais e genéticos e da evolução molecular da doença pode capacitar pesquisadores e médicos a prevenir e tratar essa neoplasia mortal (RAWLA, SUNKARA, BARSOUK, 2019).

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, Thiciane Carvalho. **Isolamento, seleção e caracterização de Enterococos produtores de enterocinas isolados do queijo de Coalho artesanal produzido nos Municípios de Cachoeirinha e Arcoverde – PE, Brasil.** Tese de doutorado (Doutor em Biociência Animal) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2014.

AMERICAN CANCER SOCIETY 2019. **Cancer facts & figures 2019.** Atlanta: American Cancer Society, 2019. Data de acesso: 30 de Agosto de 2020.

ANKAIAH, Dasari; PALANICHAMY, Esakkiraj; ANTONYRAJ, Christian Bharathi; AYYANNA, Repally; PERUMAL, Venkatesh; AHAMED, Syed Ibrahim Basheer; ARUL, Venkatesan. Cloning, overexpression, purification of bacteriocin enterocin-B and structural analysis, interaction determination of enterocin-A, B against pathogenic bacteria and human cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 502-512, 2018.

ASHA; GAYATHRI, Devaraja. Synergistic impact of Lactobacillus fermentum, Lactobacillus plantarum and vincristine on 1,2-dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis in mice. **Exp. Ther. Med**, v. 3, n. 6, p. 1049–1054., 2012.

BAINDARA, Piyush; KORPOLE, Suresh; GROVER, Vishakha. Bacteriocins: perspective for the development of novel anticancer drugs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 10393–10408, 2018.

BALCIUNAS, Eduardo Marcos; MARTINEZ, Fabio Andres Castillo; TODOROV, Svetoslav Dimitrov; FRANCO, Bernadette Dora Gombossy de Melo; CONVERTI, Attilio; OLIVEIRA, Ricardo Pinheiro de Souza. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 134-142, 2013.

BHARDWAJ, Arun; MALIK, R. K.; CHAUHAN, Prashant. Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods. **Indian J Microbiol**, v. 48, n. 3, p. 317–325, 2008.

BRANDALIZE, Claudia Carneiro. **Potencial probiótico de Enterococcus faecium isolados de queijo.** Tese de Mestrado ( Mestre em Tecnologia de alimentos) – Universidade Tecnológica do Paraná, 2013.

BRUNO, L.M.; CARVALHO, J. D. G. Microbiota Láctica de Queijos Artesanais. Embrapa Agroindústria Tropical, Documentos 124, ISSN 1677-1915. FortalezaCE. p.30, 2009.

CALAÇA, Priscilla R A; BEZERRA, Raquel P; PORTO, Ana L F; CAVALCANTI, Maria T H. Podem as bactérias ácido lácticas probióticas apresentarem efeito antitumoral em modelo animal de câncer de cólon? Uma revisão da literatura. **Pesq. Vet. Bras**, v. 37, n. 6, p. 587- 592, 2017.

CHEN, H.; HOOVER, D.G. Bacteriocins and their Food Applications. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 2, n. 3, p. 82-100, 2003.

CHEN, Chien-Chang; LIN, Wei-Chuan; KONG, Man-Shan; SHI, Hai Ning; WALKER, W Allan; LIN, Chun-Yen; HUANG, Ching-Tai; LIN, Yung-Chang; JUNG, Shih-Ming; LIN, Tzou-Yien. Oral inoculation of probiotics *Lactobacillus acidophilus* NCFM suppresses tumour growth both in segmental orthotopic colon cancer and extra-intestinal tissue. **Br J Nutr**, v. 107, n. 11, p. 1623-1634, 2012.

CLEVELAND, Jennifer; MONTVILLE, Thomas J.; NES, Ingolf F.; CHIKINDAS, Michael L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **Int. J. Food Microbiol**, v. 71, n. 1, p. 1-20, 2001.

COTTER, Paul D; HILL, Colin; ROSS, R. Paul. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 10, p. 777-788, 2005.

COTTER, Paul D.; HILL, Colin; ROSS, R. Paul. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? **Nat. Rev. Microbiol.** v. 11, n. 2, p. 95-105, 2013.

DAS, Arup Jyoti; DAS, Manas Jyoti; MIYAJI, Tatsuro; DEKA, Sankar Chandra. Growth and metabolic characterization of four lactic acid bacteria species isolated from rice beer prepared in Assam, India. **Acces Microbiology**, v. 1, n. 4, p. 1-14, 2019.

DRIDER, Djamel; FIMLAND, Gunnar; HÉCHARD, Yann; MCMULLEN, Lynn M; PRÉVOST, Hervé. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiol Mol Biol Ver.**, v. 70, n. 2, p. 564-582, 2006.

DRIDER, Djamel; BENDALI, Farida; NAGHMOUCHI, Karim; CHIKINDAS, Michael Leonidas. Bacteriocins: Not Only Antibacterial Agents. **Probiotics & Antimicro. Prot.**, v. 8, n. 4, p. 177-182, 2016.

FIGLIUOLO, V. R.; COUTINHO-SILVA, R.; COUTINHO, C. M. L. M. Contribution of sulfate-reducing bacteria to homeostasis disruption during intestinal inflammation. **Life Sciences**. v. 215, p. 145- 151, 2018.

FRANZ, C. M. A. P.; BELKUM, M. J. V.; HOLZAPFEL, W. H.; ABRIOUEL, H.; GALVEZ, A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. **Federation of European Microbiological Societies**. v. 31, n.3, p. 293 –310, 2007.

FOULQUIE-MORENO, Maria R.; SARANTINOPOULOS , P.; TSAKALIDOU, Effie; VUYST, Luc. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 1-24, 2006.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. 1. ed. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, 2000.

GARCIA-SOLACHE, MÓNICA & RICE, LOUIS B. The Enterococcus: a Model of Adaptability to Its Environment. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 32, n. 2, p. 1-28, 2019.

GIRAFFA, Giorgio. Functionality of enterococci in dairy products. **Int J Food Microbiol**, v. 88, n. 2-3, p. 215-222, 2003.

HOSKIN , David W; RAMAMOORTHY, Ayyalusamy. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochim Biophys Acta** , v. 1778, n. 2, p. 357–375, 2008.

HUNG, WEI-WEN; CHEN, YEN-HSU; TSENG, SUNG-PIN; JAO, YA-TING; TENG, LEE-JANE. Using *groEL* as the target for identification of *Enterococcus faecium* clades and 7 clinically relevant *Enterococcus* species. **Journal of microbiology, immunology and infetion**. v.52, n. 2, p. 255-264, 2019.

INCA 2020. **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro. Data de acesso: 10 de Agosto de 2020.

JASKULSKI, Itiane Barcellos; UECKER, Julia; BORDINI, Fernanda; MOURA, Fernanda; GONÇALVES, Taiciane; CHAVES, Natalie Garcia; CAMARGO, Flávio; GRECCO, Fabiane Borelli; FIORENTINI, Ângela Maria; SILVA, Wladimir Padilha; ANDREAZZA, Robson; PIENIZ, Simone. In vivo action of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolate (R7) with probiotic potential in the stabilization of cancer cells in the colorectal epithelium. **Process Biochemistry**, v. 91, p. 165-171, 2020.

JOHNSON, Constance M; WEI, Caimiao; ENSOR, Joe E; SMOLENSKI, Derek J; AMOS, Christopher I; LEVIN, Bernard; BERRY, Donald A. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. **Cancer Causes Control**, v. 24, n. 6, p. 1207-1222, 2013.

KLAENHAMMER , T R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol Rev** ,v. 12, n. 1-3, p. 39-85, 1993.

KLEIN, Gunter; PACK, Alexander; BONAPARTE, Christine; REUTER, Gerhard. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41,N. 2, p. 103-125, 1998.

KOLLIGS, Frank T. Diagnostics and Epidemiology of Colorectal Cancer. **Visc Med**, v. 32, n. 3, p. 158–164, 2016.

KUMAR, R Satish; KANMANI, P; YUVARAJ, N; PAARI, K A; PATTUKUMAR, V; THIRUNAVUKKARASU, C; ARUL, V. *Lactobacillus plantarum* AS1 isolated from south Indian fermented food Kallappam suppress 1,2-dimethyl hydrazine (DMH)-induced colorectal cancer in male Wistar rats. **Appl Biochem Biotechnol**, [s. l.], v. 166, n. 3, p. 620-631, 2012.

MAIA, Priscilla Lima; FIORIO, Bárbara de Cerqueira; SILVA, Francisco Regis. A influência da microbiota intestinal na prevenção do câncer de cólon. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 47, n. 1, p. 182-197, 2018.

MAKAROVA, Kira S.; KOONIN, Eugene V. Evolutionary Genomics of Lactic Acid Bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 4, p. 1199–1208, 2007.

MANERO, Albert; BLANCH, Anicet R. Identification of Enterococcus spp. with a Biochemical Key. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4425–4430, 1999.

MARLEY, Andrew R; NAN, Hongmei. Epidemiology of colorectal cancer. **Int J Mol Epidemiol Genet**, v. 7, n. 3, p. 105–114, 2016.

MASOOD, Muhammad Irfan; QADIR, Muhammad Imran; SHIRAZI, Jafir Hussain; KHAN, Ikram Ullah. Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 91–98, 2011.

MEDEIROS, Mateus Marinho; SILVA, Marcelane de Lira; BARRETO, Maria Irisdene Batista; SEABRA, Cícera Amanda Mota. Rastreamento e Diagnóstico Precoce de Cancer Colorretal: Revisão Integrativa. **Revista Interdisciplinar em Saúde**, v. 5, n. 2, p. 310-327, 2018.

MIKKILI, Indira; VENKATESWARULU, T. C.; PRABHAKAR, Kodali Vidya; PEELE, K. Abraham; KRUPANIDHI, S. Isolation and characterization of bacteriocin producing Enterococcus casseliflavus and its antagonistic effect on Pseudomonas aeruginosa. **Karbala International Journal of Modern Science**, v. 4, n. 4, p. 361-368, 2018.

MORENO, M R Foulquié; SARANTINOPOULOS, P; TSAKALIDOU, E; VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **Int J Food Microbiol**, v. 106, n. 1, p. 1-24, 2006.

NES, Ingolf F; JOHNSBORG, Ola. Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. **Curr Opin Biotechnol**, v. 15, n. 2, p. 100-104, 2004

NOROUZI, Zohreh; SALIMI, Ali; HALABIAN, Raheleh; FAHIMI, Hossein. Nisin, a potent bacteriocin and anti-bacterial peptide, attenuates expression of metastatic genes in colorectal cancer cell lines. **Microb Pathog.**, v. 123, p. 183-189, 2018.

OGAKI, Mayara Baptistucci; FURLANETO, Márcia Cristina; MAIA, Luciana Furlaneto. Revisão: Aspectos gerais das bacteriocinas. **Brazilian Journal of food Technology**, v. 18, n. 4, p. 267-276, 2015.

RAWLA, Prashanth; SUNKARA, Tagore; BARSOUK, Adam. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. **Prz Gastroenterol**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 89-103, 2019.

RIBOLDI, Gustavo Pelicoli; FRAZZON, Jeverson; D'AZEVEDO, Pedro Alves; FRAZZON, Ana Paula Guedes. Antimicrobial resistance profile of Enterococcus spp isolated from food in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 125-128, 2009.

RILEY, Margaret A; WERTZ, John E. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. **Biochimie**, v. 84, n. 5-6, p. 357-364, 2002.

RIVERA-ESPINOZA, Yadira; GALLARDO-NAVARRO, Yoja. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 1-11, 2010.

SAMEDI, Lesly; CHARLES, Albert Linton. Evaluation of Technological and Probiotic Abilities of Local Lactic Acid Bacteria. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 9-19, 2019.

SANTOS, Lucielen Oliveira. **Estudo da produção e purificação parcial de enterocina utilizando Enterococcus spp.** Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 2004.

SANTOS, Dayane da Silva ; CALAÇA, Priscilla Régia de Andrade ; PORTO, Ana Lúcia Figueiredo. ; SOUZA, Paulo Roberto Eleutério ; Holanda. Caracterização parcial probiótica e molecular de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de coalho da cidade de Arcoverde - Pernambuco. **Iniciação científica - CESUMAR**, v. 21, n. 1, p. 7, 2019.

SANTOS, Dayane da Silva; CALAÇA, Priscilla Régia de Andrade; PORTO, Ana Lúcia Figueiredo; SOUZA, Paulo Roberto Eleutério; FREITAS, Nara Suzy Aguiar; SOARES, Maria Taciana Cavalcanti Vieira. What Differentiates Probiotic from Pathogenic Bacteria? The Genetic Mobility of *Enterococcus faecium* Offers New Molecular Insights. **OMICS A Journal of Integrative Biology**, v. 24, 2020.

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. A importância de probióticos para o controle e/ou reestruturação da microbiota intestinal. **Revista científica do ITPAC**. v.4, n.1, p. 40-49, 2011.

SAVIJOKI, Kirsi; INGMER, Hanne; VARMANEN, Pekka. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 71, p. 394–406, 2006.

SETTANNI, Luca; MOSCHETTI, Giancarlo. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 691-697, 2010.

SILVA, R.A.; BISMARA, P.A.; MOURA, R.B.; LIMA FILHO, J.L.; PORTO, A.L.F.; CAVALCANTI, M.T.H. Avaliação da microbiota bacteriana do queijo de coalho artesanal produzido na região Agreste do estado de Pernambuco. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 64, n. 6, p. 1732-1738, 2012.

SILVA, Márcio; ERRANTE, Paolo Ruggero. Câncer colorretal: fatores de risco, diagnóstico e tratamento. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 13, n. 33, p. 133-140, 2016.

ŚWIDERSKA, Magdalena; CHOROMAŃSKA, Barbara; DĄBROWSKA, Ewelina; KONARZEWSKA-DUCHNOWSKA, Emilia; CHOROMAŃSKA, Katarzyna; SZCZURKO, Grzegorz; MYŚLIWIEC, Piotr; DADAN, Jacek; ŁADNY, Jerzy Robert; ZWIERZ, Krzysztof. Diagnostics and Epidemiology of Colorectal Cancer. **Contemp Oncol (Pozn)**, v. 18, n. 1, p. 1–6, 2014.

TORMEN, Sílvia Helena. **Enterococcus spp. Isolado de vegetais: Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e formação de biofilme.** Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2016

YANG, Shih Chun; LIN, Chih-Hung; SUNG, Calvin T; FANG, Jia-You. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. **Front. Microbiol.**, v. 5, p. 1-10, 2014.

YERLIKAYA, Oktay; AKBULUT, Necati. 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, n. 1, p. 98-107, 2020.

ZANDONÁ, Bianca; CARVALHO, Luciano Pinto; SCHIMEDT, Julia; KOPPE, Daniela Cerqueira; KOSHIMIZU, Ruy takashi; MALLMANN, Afonso Calil Mury. Prevalência de adenomas colorretais em pacientes com história familiar para câncer colorretal. **Rev bras Coloproct**, v. 31, n. 2, p. 147-154, 2011.

ZANDONAI, Alexandra Paola; SONOBE, Helena Megumi; SAWADA, Namie Okino. Os fatores de riscos alimentares para câncer colorretal relacionado ao consumo de carnes. **Rev Esc Enferm USP**, v. 46, n. 1, p. 234-239, 2012.



## **7. CAPÍTULO II:**

### **AS ENTEROCINAS PREVINEM O CÂNCER COLORRETAL? UMA ANÁLISE EXPERIMENTAL**

**As enterocinas previnem o câncer colorretal? Uma análise experimental****How do enterocines prevent or colorretal cancer? An experimental analysis****¿Cómo prevenen las enterocinas o el cáncer colorretal? Un análisis experimental****Resumo**

Objetivou-se com esse 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. Os resultados obtidos neste estudo foram positivos para a utilização das enterocinas produzidas por E137v e E141v oriundas do queijo de coalho artesanal de Pernambuco, como uma suplementação promissora na prevenção e tratamento contra câncer colorretal, sendo, no entanto, necessários novos estudos, com ampliação do número de animais para conferir maior segurança.

**Palavras-chave:** 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 enterokines on

colorectal cancer induced by 1,2 Dimethylhydrazine (DMH) in Wistar rats. The results obtained in vitro demonstrated the peptide nature of the enterokines as well as their effectiveness in terms of antimicrobial activity. As for the in vivo results 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 enterokines, which can be explained by the possible apoptotic stimulation, aiming at the inhibition of cancer cells. The results obtained in this study were positive for the use of enterokines produced by E137v and E141v from artisanal rennet cheese from Pernambuco, as a promising supplement in the prevention and treatment against colorectal cancer, however, further studies are needed, with expansion of number of animals to provide greater security

**Keywords:** Lactic Acid Bacteria. Enterocin. Colorectal Cancer.

## **Resumen**

El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de las enterocinas producidas por *Enterococcus faecium* 141v y 137v, probióticos, de queso de cuajo artesanal de Pernambuco sobre el desarrollo de cáncer colorrectal en un estudio in vivo. Como metodología, se llevaron a cabo pruebas de sensibilidad a las proteasas para comprobar sus propiedades proteicas, además de su actividad biológica como antimicrobiano. Se utilizó la ecografía para evaluar el efecto de las enterocinas sobre el cáncer colorrectal inducido por 1,2 dimetilhidrazina (DMH) en ratas Wistar. Los resultados obtenidos in vitro demostraron la naturaleza peptídica de las enterocinas así como su eficacia en términos de actividad antimicrobiana. En cuanto a los resultados in vivo evaluados mediante ecografía, se pudo observar la disminución del grosor de la pared intestinal de las ratas que fueron sometidas a inducción de cáncer colorrectal y tratadas con enterocinas, lo que puede explicarse por la posible estimulación apoptótica, con el objetivo de inhibir las células cancerosas. Los resultados obtenidos en este estudio fueron positivos para el uso de enterocinas producidas por E137v y E141v a partir de queso de cuajo artesanal de Pernambuco, como un complemento prometedor en la prevención y tratamiento contra el cáncer colorrectal, sin embargo, se necesitan más estudios, con expansión de número de animales para brindar mayor seguridad.

**Palabras clave:** Bacterias del Ácido Láctico. Enterocinas. Cáncer Colorrectal.

## 7.1 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 tem 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 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, peptídeos produzidos a partir dos *Enterococcus*, que apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas e geralmente de origem alimentar (Franz et. al., 2007)

O gênero *Enterococcus*, faz parte das BAL, que pode ser encontrado no solo, na água, em associação com plantas, em produtos fermentados e compondo 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 as células cancerígenas, provavelmente induzindo a apoptose dessas células contribuindo para ajudar na prevenção e no controle do câncer colorretal.

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia da enterocina produzida pelas *Enterococcus faecium* 141v e 137v, probióticas, oriundas do queijo de coalho artesanal de Pernambuco sobre o câncer colorretal através de um estudo *in vivo*.

## **7.2 Material e Métodos**

### **7.2.1 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.

## 7.2.2 Isolamento 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 ressuspendido 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).

## 7.2.3 Caracterização das enterocinas

### 7.2.3.1 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 pseudomonae* ATCC 26665, *Enterococcus faecalis* ATCC 6057, *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Os resultados são mostrados na tabela 1.

### 7.2.3.2 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 10<sup>7</sup> UFC/mL) e 100 µL das enterocinas E141v e E137v na presença de 10 µL da 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).

## **7.2.4 Desenho experimental**

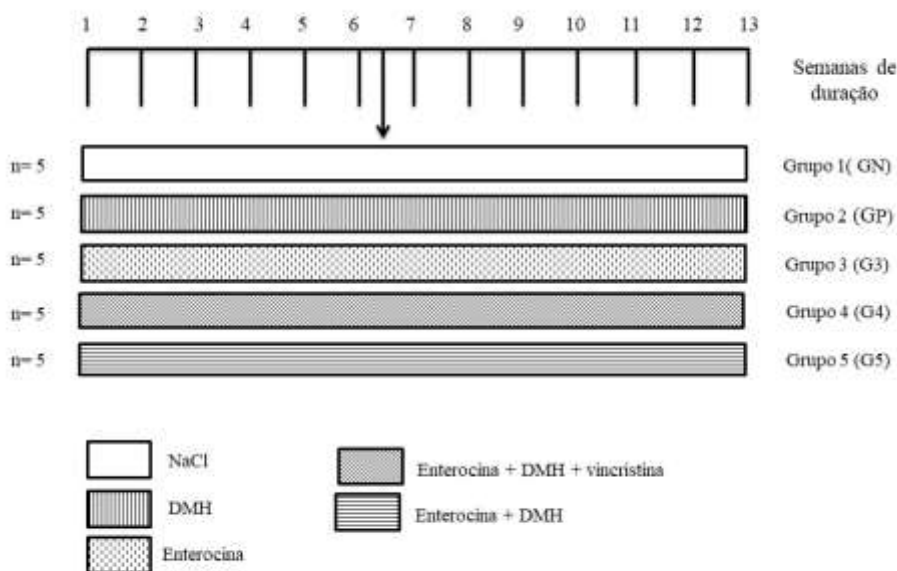
### **7.2.4.1 Animais e dieta**

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  $28 \pm 2$  °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.

### 7.2.4.2 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 micro-organismos 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).

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



Fonte: Os autores



### 7.2.5 Ultrassonografia abdominal para avaliação do efeito das enterocinas sobre o câncer colorretal

Os ratos Wistar foram devidamente contidos, sem necessidade de sedação, para realização dos exames ultrassonográficos. Os mesmos foram realizados da 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.

## 7.3. Resultados

### 7.3.1 Caracterização das enterocinas quanto ao seu perfil protéico

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 <sup>-1</sup>	
	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

### 7.3.2 Caracterização das enterocinas 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 <sup>-1</sup>	
	E141v	E137v
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	27	27
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 29665	107	53
<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

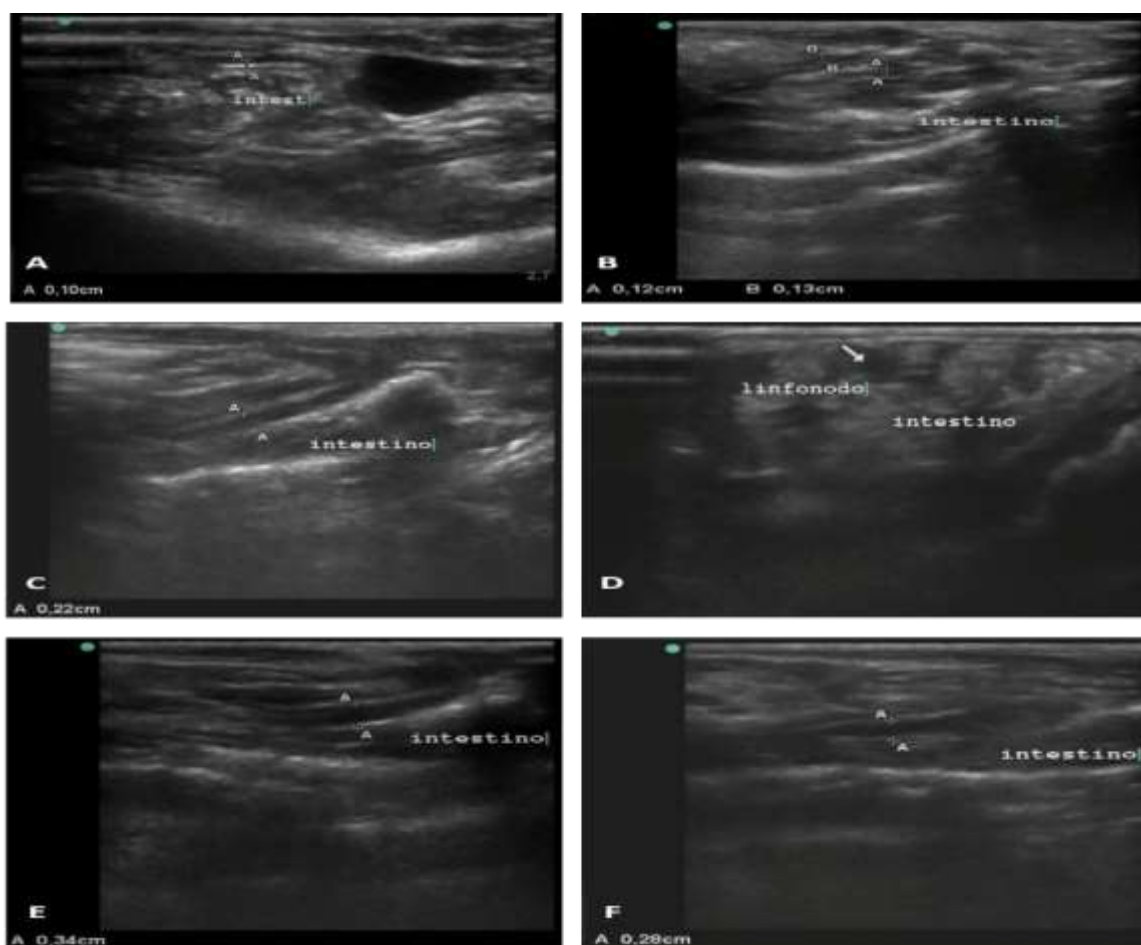
### 7.3.3 Efeito das enterocinas aplicadas sobre o câncer colorretal

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
<b>Pré-indução</b>	0,11 cm	0,10 cm	0,12 cm	0,13 cm	0,12 cm
<b>Durante indução</b>	0,11 cm	0,18 cm	0,12 cm	0,14 cm	0,14 cm
<b>Pós- indução</b>	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

## 7.4 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 de 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.

A diminuição do espessamento da parede provavelmente foi em decorrência do aumento de apoptose nas células doentes induzidas pelas enterocinas. Esse provável aumento da 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 desse 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 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 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 microorganismos 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.

### **7.5 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. 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 nesse trabalho foram satisfatórios e enfatizam a necessidade de estudos mais aprofundados, assim como agregam conhecimentos em diversas áreas como biotecnologia, microbiologia, medicina e farmacologia.

### **7.6 Agradecimentos**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPQ, ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação-PIBITI, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES e a Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE.

### **7.7 Referências**

American Cancer Society. Cancer facts & figures 2019. Atlanta: American Cancer Society, 2019.

Ahmadi S.; Ghollasi M.; Hosseini HM. (2017). The apoptotic impact of nisin as a potent bacteriocin on the colon cancer cells. *Microbial Pathogenesis*. 111: 193-197

Ankaiah D.; Palanichamy E.; Perumal V. et al. (2017). Probiotic characterization of *Enterococcus faecium* por1: Cloning, over expression of Enterocin-A and evaluation of antibacterial, anticancer properties. *Journal of Functional Foods*. 38:280–292.

Asha; Gayathri, Devaraja (2012). Synergistic impact of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and vincristine on 1,2-dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis in mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 3: 1049–1054.

Apolônio ACM. (2008). Purification and partial characterization of a bacteriocina produced by *Eikenella corrodens*. *Journal of Applied Microbiology*. 104:508-514.

Avaiyarasi ND.; Ravindran AD.; Venkatesh P.; Arul V. (2016). *In vitro* selection, characterization and cytotoxic effect of bacteriocin of *Lactobacillus sakei* GM3 isolated from goat milk. *Food Control*. 69:124-133.

Baindara PK.; Grover V. (2018). Bacteriocins: perspective for the development of novel anticancer drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102:10393-10408.

Bromberg R.; Moreno I.; Delboni RR.; Cintra, HC. (2006). Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis ssp. hordniae* CTC484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 26:135-144.

Calaça PRA.; Bezerra RP.; Porto ALF.; Cavalcanti MTH. (2017). Podem as bactérias ácido lácticas probióticas apresentarem efeito antitumoral em modelo animal de câncer de cólon? Uma revisão da literatura. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 37:587-592.

Chikindas ML.; Weeks R.; Drider D.; Chistyakov V.; Dicks LMT. (2018). Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology*. 49:23-28.

Das AJ.; Das MJ.; Miyaji T. et al. (2019) Growth and metabolic characterization of four lactic acid bacteria species isolated from rice beer prepared in Assam, India. *Access Microbiology*. 1: 1-14

Drider D.; Bendali F.; Naghmouchi K.; Chikindas ML. (2016). Bacteriocins: Not Only Antibacterial Agents. *Probiotics & Antimicro*. 8:177-182.

Franz CMAP.; Belkum MJV.; Holzapfel WH.; Abriouel H.; Galvez A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *Federation of European Microbiological Societies*. 3:293-310.

Garcia-solache, M.; RICE, LB. (2019). The *Enterococcus*: a Model of Adaptability to Its Environment. *Clinical Microbiology Reviews*. 32:1-28

Garneau S.; Martin NI.; Vederas JC. (2002). Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*. 84:577–592.

Haghshenas B.; Abdullah N.; Nami Y.; Radiah D.; Rosli R.; Khosroushahi AY. (2014). 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*. 30:51-59.

Hung W.; Chen Y.; Tseng S. et al. (2019). Using *groEL* as the target for identification of *Enterococcus faecium* clades and 7 clinically relevant *Enterococcus* species. *Journal of microbiology, immunology and infection*. 52:255-264.

Hoskin, DW; Ramamoorthy, A. (2008). Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta*. 1778:357–375.

Instituto Nacional do Câncer - INCA 2020. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro. Data de acesso: 10 de Agosto de 2020.

Katharopoulos E.; Touloupi K.; Touraki M. (2016). Monitoring of multiple bacteriocins through a developed dual extraction protocol and comparison of HPLC-DAD with turbidometry as their quantification system. *Journal of Microbiological*. 127:123-131.

Mayr-Harting A.; Hedges AJ.; Berkeley RCW. (1972). Methods for studying bacteriocins. In: Norris, J. R., Ribbons, D. W. (ed.) *Methods in Microbiology*. New York, Academic Press Inc., 7:315-422.

Molska M.; Reguła J. (2019). Potential Mechanisms of Probiotics Action in the Prevention and Treatment of Colorectal Cancer. *Review Nutrients*. 11:1-17.

Moreno I.; Lerayer ALS.; Baldini VLS.; Leitão MFF. (2000). Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*. 31:184-192.

Moreno I.; Venkateswarulu TC.; Prabhakar KV.; Peele KA.; Krupanidhi S. (2018). Isolation and characterization of bacteriocin producing *Enterococcus casseliflavus* and its antagonistic



effect on *Pseudomonas aeruginosa*. *Karbala International Journal of Mordern Science*. 4:361-368.

Samedi L.; Charles AL. (2019). Evaluation of Technological and Probiotic Abilities of Local Lactic Acid Bacteria. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*. 7:9-19.

Santos DS.; Calaça PRA.; Porto ALF. 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*. 24:1-9

Santos DS.; Calaça PRA.; Porto ALF. et al. (2019). Caracterização parcial probiótica e molecular de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de coalho da cidade de Arcoverde - Pernambuco. *Iniciação Científica – CESUMAR*. 21:7-14.

Todorov SD. (2010). Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from Beloura and Chouriço, traditional pork products from Portugal. *Meat Science*. 84:334-343.

Yerlikaya O.; Akbulut N. (2020). 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*. 73:98-107