

## EFEITO DOS PROBIÓTICOS *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *Toyoi* NA IMUNIDADE HUMORAL DE CAMUNDONGOS FRENTE À PROTEÍNA RECOMBINANTE INTERNALINA A (rInIA) DE *Listeria monocytogenes*

CASTELLI, Regina Maria<sup>1,2</sup>; MAGALHÃES, Carolina Georg<sup>1</sup>; MENDONÇA, Marcelo<sup>1,2</sup>; CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo<sup>1</sup>; MOREIRA, Ângela Nunes<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunologia Aplicada, Cenbiot/CDTec – UFPel; <sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia de Alimentos, DCTA/FAEM – UFPel; <sup>3</sup>Faculdade de Nutrição – UFPel - Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900, carolgmagalhaes@gmail.com

### 1 INTRODUÇÃO

Probióticos podem ser definidos como microrganismos vivos que quando ingeridos em determinada quantidade, apresentam efeito benéfico sobre a saúde e bem-estar do hospedeiro (FAO-WHO, 2001). São utilizados na prevenção e tratamento de doenças, na regulação da microbiota intestinal, em distúrbios do metabolismo gastrointestinal, como imunomoduladores e como promotores do crescimento frente ao uso de antibióticos. (COPPOLA, 2004).

Os probióticos atuam no desenvolvimento e a maturação do sistema imune de mucosa e sistêmico do hospedeiro, prevenindo a apoptose de linfócitos e estimulam sua expansão clonal. Também agem na manutenção da barreira mucosa intestinal e na produção de anticorpos (IgA intestinal e sérica) na atividade de fagócitos e dos linfócitos matadores naturais. Reduzem a produção intestinal de citocinas pró-inflamatórias e aumentam a produção intestinal de citocinas anti-inflamatórias (PASCHOAL *et al.*, 2010).

Atualmente, o único gênero de leveduras utilizado como probiótico é o *Saccharomyces* (BUTS & KEYSER, 2006). No entanto, dentre as leveduras, a espécie do gênero que se destaca é a *Saccharomyces boulardii*. Com relação às bactérias, os gêneros utilizados como probióticos são *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium*. Contudo, outras bactérias como o *Bacillus cereus* var. *Toyoi*, também apresentam potencial probiótico (COPPOLA, 2004).

Os probióticos *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *Toyoi*, além de possuírem capacidade de melhorar a digestão e absorção de nutrientes (BUTS & KEYSER, 2006), bem como prevenir ou tratar distúrbios intestinais (ELMER & MCFARLAND, 2001; GUSLANDI *et al.*, 2003), promover ganho de peso (COPPOLA & TURNES, 2004) e melhorar a conversão alimentar (WILLIMS *et al.*, 2009), apresentam ainda papel na estimulação da resposta imune humoral (COPPOLA *et al.*, 2004).

A levedura *S. boulardii* e esporos da bactéria *B. Toyoi* podem ser empregados na ampliação da resposta imune frente à vacinação, podendo ser uma alternativa para melhorar a eficiência de vacinas comerciais (ROOS, 2009). Estudos demonstraram, que a administração desses mesmos probióticos elevaram a resposta imune em camundongos vacinados com vacina de *Escherichia coli* multivalente (COPPOLA *et al.*, 2005). Sendo assim, a utilização de diferentes antígenos co-administrados com probióticos para estimular o sistema imunológico, vem sendo estudada.

*Listeria monocytogenes*, agente responsável pela listeriose em humanos e que pode acarretar o desenvolvimento de abortos, meningites e septicemia, tem sido considerada um grande problema de saúde pública (MANTILLA, 2007). Um dos principais mecanismos de invasão de *L. monocytogenes* é através da proteína

Internalina A (InIA), que é uma proteína de superfície responsável por intermediar a ligação do patógeno à célula do hospedeiro (CRUZ, 2008). Uma forma recombinante da proteína foi produzida por Mendonça *et al.* (2007) e utilizada como antígeno no presente trabalho.

O presente estudo objetivou a avaliação da influência dos probióticos *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Saccharomyces boulardii* sobre a resposta humoral de camundongos, frente a administração da proteína recombinante Internalina A (rInIA) de *L. monocytogenes*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Microrganismos, condições de cultivo e preparo das rações contendo os probióticos

Os microrganismos utilizados são provenientes do Núcleo de Biotecnologia, CDTec-UFPel. Os probióticos foram cultivados e produzidos segundo as recomendações de Roos (2009), com modificações. O preparo das rações contendo os probióticos, também seguiu o protocolo preconizado por Roos (2009), com adaptações.

### 2.2 Efeito imunomodulador de *S. boulardii* e *B. cereus* var. Toyoi em camundongos

Para esse experimento, foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c, provenientes do Biotério Central da UFPel, que foram manipulados de acordo com as normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Os animais foram divididos em três grupos, compostos de 12 animais cada: os animais do grupo 1 (G1, grupo controle) não receberam os probióticos na ração; os do grupo 2 (G2) receberam *S. boulardii* adicionado a ração; e os do grupo 3 (G3) receberam esporos de *B. Toyoi*. Os camundongos tiveram quinze dias para adaptação à ração contendo os probióticos e a receberam durante todo o experimento. No 15º dia, os animais foram imunizados via intramuscular, com aproximadamente 3 µg da proteína internalina A recombinante (rInIA) de *L. monocytogenes* (MENDONÇA, *et al.* 2007), em combinação com 0,8% de hidróxido de alumínio. Amostras de soro foram coletadas dos camundongos nos dias 0 e 29, e posteriormente submetidas a um ELISA indireto, para a detecção e titulação de anticorpos anti-InIA.

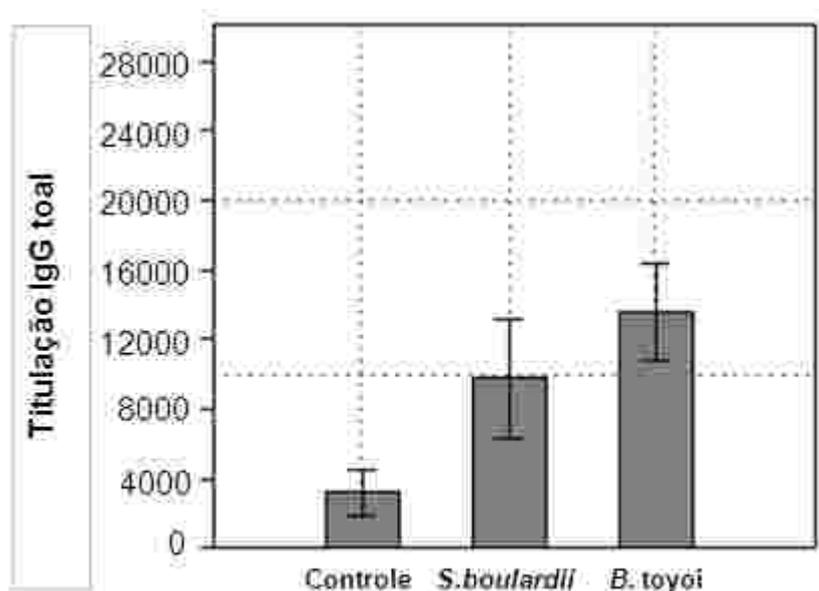
Para a realização do ELISA indireto, placas de microtitulação de 96 cavidades foram sensibilizadas com 5µg/ml de rInIA diluída em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6) e incubadas a 4º C *overnight*. Soros do 29º dia obtido dos animais, diluídos em base 2 em solução salina fosfatada tamponada (PBS), pH 7,4 acrescida de 0,5% de Tween 20 (PBS-T), foram utilizados como anticorpos primários. Os soros do dia zero dos animais e o soro policlonal anti-rInIA foram utilizados, respectivamente, como controles negativo e positivo. Anticorpo de cabra anti-Ig de camundongos conjugado a peroxidase, foi utilizado como anticorpo secundário. Todas as reações ocorreram por 1 h (com exceção da sensibilização). Os reagentes foram utilizados a um volume de 50 µL/cavidade e após todas as etapas de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com 200 µL/cavidade de PBS-T. Após a remoção do excesso de conjugado, através de 5 lavagens com PBS-T, as reações foram reveladas através da adição da solução cromógena ortofenilenodiamina (OPD), diluída em tampão fosfato-citrato pH 4,0 (0,2 M com 0,01% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). As placas foram mantidas no escuro por 15 min a temperatura ambiente e a leitura das absorbâncias realizada em espectrofotômetro para microplacas a 450 nm. Os títulos foram calculados, a partir dos resultados das absorbâncias dos soros do dia zero, somado 0,05 de desvio padrão.

### 2.3 Análise Estatística

Os títulos dos anticorpos foram comparados utilizando análise de variância (ANOVA).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais dos três grupos apresentaram resposta imunológica humoral contra a proteína rInIA. Entretanto, os animais suplementados com probióticos (G2 e G3) tiveram uma resposta estatisticamente superior à dos animais do grupo controle (G1). Além disso, os animais do grupo 3, (G3, grupo suplementado com *B. Toyoi*), apresentaram títulos superiores aos dos animais do grupo 2 (G2, grupo suplementado com *S. boulardii*), mas a diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 1).



**Figura 1.** Titulação de anticorpos anti-InIA em soros de camundongos, suplementados ou não com os probióticos *S. boulardii* e *B. Toyoi*.

Os resultados obtidos no presente estudo foram semelhantes aos encontrados no estudo de Ross (2009). Em um experimento realizado com ovinos, o grupo suplementado com *B. Toyoi*, quando vacinado contra o Herpes vírus Bovino tipo-5, apresentou resposta humoral significativamente superior aos grupos controle e suplementado com *S. boulardii*. Nesse mesmo estudo, em um experimento realizado com camundongos, usando o mesmo antígeno vacinal, o grupo suplementado com *B. Toyoi* apresentou resposta humoral em média 1,3 vezes superior ( $p < 0.05$ ) a do grupo controle. Já no estudo de Coppola *et.al* (2005), camundongos suplementados com *S. boulardii* apresentaram soroconversão três vezes superior aos animais suplementados com *B. Toyoi*, frente a bacterina tetravalente de *E. coli*.

## 4 CONCLUSÃO

A partir do estudo realizado, pode-se concluir que a administração de rações contendo os probióticos *S. boulardii* e *B. Toyoi* para camundongos, elevou a resposta imune humoral frente ao antígeno rInIA, sugerindo que esses probióticos são eficazes na modulação do sistema imune.

## 5 REFERÊNCIAS

BUTS, J.P. & De KEYSER N. Effects of *Saccharomyces boulardii* on Intestinal Mucosa. **Digestive diseases and sciences**, v. 51, p. 1485-1492, 2006.

COPPOLA M.M.; CONCEIÇÃO F.R.; GIL-TURNES C. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. Toyoi on the humoral and cellular response of mice to vaccines. **Food and Agricultural Immunology**. v.16, n.3, p.213-219. 2005.

COPPOLA, M.M.; GIL-TURNES, C. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1297-1303, jul-ago, 2004.

CRUZ, C.; MARTINEZ, M.; DESTRO, M.T. *Listeria monocytogenes*: UM AGENTE INFECCIOSO AINDA POUCO CONHECIDO NO BRASIL. **Alimentos e Nutrição**. Araraquara, v.19, n.2, p. 195-206, 2008

ELMER, GW & MCFARLAND, L.V. Biotherapeutic agents in the treatment of infectious diarrhea. **Gastroenterology clinics of North America**, v.30, p.837-854, 2001.

FAO-WHO: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria**. Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: <[http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf)>.

GUSLANDI, M; GIOLLO, P; TESTONI, PA. A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. **European journal of gastroenterology & hepatology**, v.15, p.669-698, 2003.

MANTILLA, S.; FRANCO, R.; OLIVEIRA, L.; SANTOS, E.; GOUVÊA, R. Importância da *Listeria monocytogenes* em alimentos do origem animal. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.14, n.1, p. 180-192, 2007

MENDONÇA, M.; CONCEIÇÃO, F.R; CERQUEIRA, G.M; DELLAGOSTIN, O.A; MOREIRA, A.N ;ALEIXO, J.A.G; SILVA, W.P. Expressão da Proteína de membrana externa InIA de *Listeria monocytogenes* visando a produção de anticorpos monoclonais. **Revista Higiene Alimentar**, v.21, p. 209-210, 2007.

PASCHOAL V, NAVES A, FONSECA A. **Nutrição Clínica Funcional: Dos princípios à prática Clínica**. 1a Ed. revisada. São Paulo: VP editora; 2010.

ROOS, T. B. **Efeito imunomodulador de *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Saccharomyces boulardii* em animais vacinados contra Herpesvírus Bovino tipo 5**. 2009. 90f. Tese (Doutorado em Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

WILLIAMS, L. D.; BURDOCK G.A.; JIMÉNEZ, G.;CASTILLO, M. Literature review on the safety of Toyocerin, a non-toxicogenic and non-pathogenic *Bacillus cereus* var. toyoi preparation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.55, p.236 - 246; 2009.