

***Saccharomyces boulardii* PROMOVE AUMENTO NA EXPRESSÃO DE IL-12 EM ANIMAIS INFECTADOS POR NEMATODA**

**LUCIANA FARIAS DA COSTA DE AVILA¹; TALITA BANDEIRA ROOS²;
CARLOS JAMES SCAINI³; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE¹**

¹ Universidade Federal de Pelotas - lufcosta@ig.com.br, fabio@leivasleite.com.br

² Universidade Federal do Pará

³ Universidade Federal do Rio Grande

1. INTRODUÇÃO

A toxocaríase é uma zoonose de distribuição mundial caracterizada como um problema de saúde pública (HAYASHI et al., 2005). A transmissão para o homem e outros hospedeiros ocorre, principalmente, pela ingestão de ovos embrionados de *Toxocara canis* que são eliminados junto às fezes dos cães (GLICKMAN e SCHANTZ, 1981). As crianças são mais suscetíveis devido ao contato frequente com o solo contaminado por ovos do parasito e também devido ao sistema imune ainda imaturo (HABLUETZEL et al., 2003). Uma característica dos helmintos que merece maior atenção é a supressão da resposta imune celular, o que permite sua permanência por até décadas no hospedeiro (MAIZELS e YASDANBAKHS, 2003).

Probióticos são microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro, sendo utilizados com sucesso na prevenção e no tratamento de doenças (HTWE et al., 2008; CANONICI et al., 2011). A levedura *Saccharomyces boulardii* é um probiótico bastante estudado e já reconhecido por reduzir episódios de diarreia (HTWE et al., 2008) e promover ação imunoestimulante e anti-inflamatória na mucosa intestinal (JAWHARA e POULAIN, 2007).

Na busca por alternativas de controle para a toxocaríase, nosso grupo tem pesquisado o efeito do probiótico *Saccharomyces boulardii* sobre larvas de *T. canis*. Os resultados destes estudos têm se mostrado muito promissores quanto à redução da infecção em modelos experimentais tratados com *S. boulardii* (Avila et al., 2012). Entretanto, o mecanismo de ação promovido por este probiótico permanece desconhecido. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de *S. boulardii* sobre a produção da interleucina 12 (IL-12), importante citocina envolvida na resposta imune inata aos parasitos, em camundongos infetados por *T. canis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção da forma infectante, ovos de *T. canis* coletados de fêmeas do parasito foram incubados em formalina 2%, a 28 °C, umidade acima de 80%, sob aerações diárias, durante 30 dias (De Savigny, 1975). A seguir, foram formados dois grupos (G1 e G2) de camundongos *Swiss*. Durante 15 dias o G1 recebeu ração suplementada com *S. boulardii*, na concentração de 10⁷ UFC/g de ração, e G2 recebeu ração sem suplementação (controle). Ao final desse período todos os animais foram inoculados com 100 ovos embrionados de *T. canis*. Após 48 h, foi realizada eutanásia e o cultivo de esplenócitos, em meio RPMI 1640 suplementado com 10% soro fetal bovino e acrescido de antibiótico e antifúngico. As células foram incubadas a 37 °C com 5% CO₂ e estimuladas com 2.5 µg mL⁻¹ de Concanavalina A. Após o cultivo,

foram coletadas em TRIZOL[®] (Invitrogen) e armazenadas a 70 °C (ROOS et al., 2012).

Foi realizada a amplificação de fragmentos do gene da citocina IL-12 em cDNA, obtido a partir de 300ng/μL de mRNA, pelo método de Real Time – PCR. As reações de PCR foram realizadas com 1 μL de cDNA, 6,25 μL de SYBR[®] Green (Invitrogen), 1 μM de cada primer e 4,25 μL de água livre de RNase (Gibco-BRL), num volume total de 12,5 μL. Foram utilizados 40 ciclos com TM de 60°C. A partir dos valores de Cycle Threshold (Ct) obtidos foi calculada a variação da expressão gênica através da comparação com a expressão de β-actina (controle). Todas as amostras foram avaliadas em duplicata. Os oligômeros iniciadores utilizados no experimento foram:

β-actin anterógrado 5'- AGAGGGAAATCGTGCGTGAC

β-actin retrógrado 5'- CAATAGTGATGACCTGGCCGT

IL-12p40 anterógrado 5' - AGCACCAGCTTCTTCATCAGG

IL-12p40 retrógrado 5' - CCTTTCTGGTTACACCCCTCC

Este projeto está registrado na CEEA-UFPel sob o número 6554 e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado pelos participantes da pesquisa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O grupo infectado por *T. canis* e suplementado com o probiótico *S. boulardii* apresentou um aumento de 9,4 vezes na expressão de IL-12 quando comparado àqueles sem suplementação, demonstrando que este probiótico estimula a resposta imune inata do hospedeiro (Figura 1).

O efeito benéfico da administração de *S. boulardii* na toxocaríase vem sendo estudado há algum tempo por nosso grupo de pesquisa. A suplementação de camundongos *Swiss* com *S. boulardii* reduziu em 36,7% a intensidade da infecção por larvas de *T. canis* (AVILA et al., 2012). Entretanto ainda há uma lacuna em relação ao mecanismo de ação envolvido. Assim, o aumento na expressão de IL-12 observado neste estudo pode ser uma peça importante para a compreensão do mecanismo de ação desenvolvido por este probiótico durante infecção por *T. canis*.

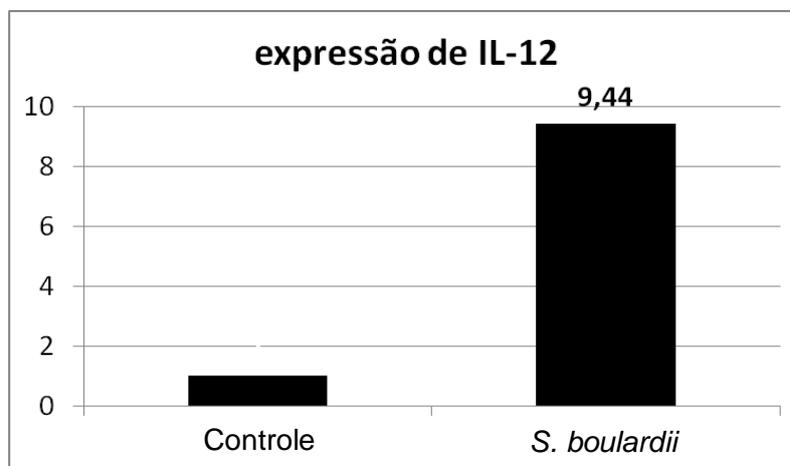


Figura 1: Expressão de IL-12 produzida em esplenócitos de animais infectados por *T. canis* e suplementados com *S. boulardii*.

Já está bem documentado que os helmintos, para se protegerem e permanecerem no hospedeiro, se comportam como potentes indutores de células Th2, principalmente pelo aumento de IL-4 (MAIZELS e YASDANBAKHSH, 2003; PINELLI et al., 2007). Da mesma maneira ocorre também com *T. canis*, onde a sensibilização de esplenócitos com larvas do parasito promove um aumento de 8,5 vezes na expressão de IL-4 e uma redução de 6 vezes na expressão de IL-12 (Avila et al., 2011). Segundo Herbert et al., (2010), essa supressão de IL-12 parece ser exercida pela IL-4, uma vez que esta citocina estaria relacionada à depressão da imunidade mediada pelas células Th1, responsáveis pela secreção de IL-12.

Considerando que a supressão de IL-12 é favorável para a sobrevivência do parasito e o probiótico *S. boulardii* promoveu o oposto, ou seja, um aumento na expressão desta citocina, estes resultados são de significativa importância no combate ao *T. canis*. Além disso, torna-se necessário avaliar a expressão de outras citocinas envolvidas na resposta imune ao *T. canis* para conhecer mais claramente o efeito benéfico deste probiótico nesta zoonose.

4. CONCLUSÃO

A administração de *S. boulardii* em animais com toxocaríase promove aumento na expressão de IL-12, podendo esta ser peça fundamental para a redução da intensidade de infecção por larvas de *T. canis*. Este resultado poderá contribuir na compreensão da ação moduladora exercida por este probiótico sobre o sistema imune.

Agradecimentos: À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVILA, L.F.C.; CONCEIÇÃO, F.R.; TELMO, P.L.; DUTRA, G.F.; SANTOS, D.G.; MARTINS, L.H.R.; BERNE, M.E.A.; SILVA, P.E.A.; SCAINI, C. J. *Saccharomyces boulardii* reduces infection intensity of mice with toxocaríasis. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 337-340, 2012.

AVILA, L.F.C.; ROOS, T.B.; SCAINI, C.J.; LEITE, F.P.L. Citocinas produzidas por esplenócitos de camundongos balb/c em resposta à estimulação “*in vitro*” com larvas (L3) de *Toxocara canis*. In: XIII Encontro de Pós-Graduação UFPel, 2011, Pelotas. Anais do XIII Encontro de Pós-Graduação UFPel, 2011, v 13.

CANONICI, A.; SIRET, C.; PELLEGRINO, E.; PONTIER-BRES, R.; POUYET, L.; MONTERO, M.P.; COLIN, C.; CZERUCKA, D.; RIGOT, V.; ANDRÉ, F. *Saccharomyces boulardii* improves intestinal cell restitution through activation of the $\alpha 2\beta 1$ integrin collagen receptor. **PLoS ONE**, v 6, p:1–12, 2011.

De SAVIGNY, D. H. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigens for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. **J Parasitol**, vol 61, p. 781-782, 1975.

GLICKMAN, L.T.; SCHANTZ, P.M. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. **Epidemiol. Rev.** vol 3, p: 230–250, 1981.

HABLUETZEL, A.; TRALDI, G.; RUGGIERI, S.; ATTILI, A.R.; SCUPPA, P.; MARCHETTI, R.; MENGHINI, G.; ESPOSITO, F. An estimation of *Toxocara canis* prevalence in dogs, environmental egg contamination and risk of human infection in the Marche region of Italy. **Vet Parasitol.** v 113, p: 243-252, 2003.

HAYASHI, E.; TUDA, J.; IMADA, M.; AKAO, N.; FUJITA, K. The high prevalence of asymptomatic *Toxocara* infection among schoolchildren in Mamado, Indonesia. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v 36, n , p:1399–1406, 2005.

HERBERT, D.B., OREKOV, T., ROLOSON, A., ILIES, M., PERKINS, C., O'BRIEN, W., CEDERBAUM, S., CHRISTIANSON, D., ZIMMERMANN, N., ROTHENBERG, M., FINKELMAN, F. Arginase I Suppresses IL-12/IL-23p40–Driven Intestinal Inflammation during Acute Schistosomiasis. **J Immunol.**, vol 184, p.1-22, 2010.

HTWE, K.; YEE, K.S.; TIN, M.; VANDENPLAS, Y. Effect of *Saccharomyces boulardii* in the treatment of acute watery diarrhea in Myanmar children: a randomized controlled study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v 78, p: 214–216, 2008.

JAWHARA, S.; POULAIN, D. *Saccharomyces boulardii* decreases inflammation and intestinal colonization by *Candida albicans* in a mouse model of chemically-induced colitis. **Med. Mycol**, v 45, p: 691–700, 2007.

MAIZELS, R.; YASDANBAKHS, M. Immunoregulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. **Nature Rev Immunol**, vol 3: 733-744, 2003.

PINELLI, E.; BRANDES, S.; DORMANS, J.; FONVILLE, M.; HAMILTON, C. M.; GIESSEN, J. *Toxocara canis*: Effect of inoculum size on pulmonary pathology and cytokine expression in BALB/c mice. **Exp Parasitol**, vol 115, p. 76-82, 2007.

ROOS, T.B.; STORI DE LARA, A.P.S.; DUMMER, L. A.; FISCHER, G.; LEITE, F.P.L. The immune modulation of *Bacillus cereus* var. *Toyo* in mice immunized with experimental inactivated Bovine Herpesvirus Type 5. **Vaccine**, v 30, p: 2173- 2177, 2012.