

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM LEVEDURA PROBIÓTICA SOBRE O HEMOGRAMA DE CAMUNDONGOS SWISS

KHADIJA BEZERRA MASSAUT¹; RAFAEL RODRIGUES²; GIULI ARGOU³;
FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO⁴; ÂNGELA NUNES MOREIRA⁵.

¹Universidade Federal de Pelotas- khadijamassaut@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas- rafelr458@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas- giulizynhah@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas- fabricao.rochedo@ufpel.edu.br

⁵Universidade Federal de Pelotas- angelanmoreira@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal, quando saudável e equilibrada, regula as funções fisiológicas, provê fatores de crescimento, protege contra infecções e estimula o sistema imunológico (SAAD et al., 2006; SANTOS & VARAVALLO, 2011). E os probióticos estabelecem-se como um suplemento, composto por agente microbiano vivo que age benéficamente no hospedeiro, melhorando o balanço microbiano do intestino de forma preventiva e/ou curativa (ANVISA, 2002). Efeitos positivos na produtividade, conversão alimentar e eficiência alimentar, têm sido constatados com o uso desses micro-organismos (CHIQUEIRI et al., 2007; GIL DE LOS SANTOS et al., 2012; GABOARDI et al., 2016).

A avaliação das contagens hematimétricas em animais é um método indireto para determinação da eficiência destes promotores de crescimento, tanto para estabelecer a resposta imunológica, quanto para analisar o metabolismo proteico e energético (JAIN, 1993; GONZÁLEZ, 1997; CHIQUEIRI et al., 2007).

Segundo MARTINS et al. (2005), por não serem inibidas pelos fatores antimicrobianos, a suplementação com leveduras apresenta-se vantajosa. E estudos com a levedura *Pichia pastoris* tem sido realizados em aves para avaliação do seu potencial probiótico, tendo em vista que esta apresenta expressiva capacidade de desenvolvimento em meios de cultura simples, a partir de resíduos de baixo custo (ÇELIK et al. 2008; GIL DE LOS SANTOS et al., 2012; FRANÇA et al, 2015; GABOARDI et al., 2016). Com base no exposto, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito da suplementação com *P. pastoris* sobre o hemograma de camundongos Swiss saudáveis.

2. METODOLOGIA

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) sob o n° 23110.006974/2015-40, teve duração de 17 dias e utilizou 30 camundongos Swiss machos, com 28 dias de idade. Os animais foram divididos em dois grupos: grupo suplementado com *P. pastoris* (PP); e grupo não suplementado, controle (C).

A levedura *P. pastoris* (X-33), suspensa em glicerol à 80% e armazenada a -20° C, foi cultivada em 1,4 L de caldo Yeast Malt (YM) e incubada por 72 h a 28°C sob agitação de 200 rpm em agitador orbital. Após, as células foram recuperadas por centrifugação a 5000 g por 15 minutos a 4°C e o *pellet* celular foi lavado duas vezes em solução salina (NaCl 0,9%). Concentrou-se o cultivo a um volume de 300 mL em solução salina 0,9% estéril e, o mesmo foi armazenado sob refrigeração durante todo o período do estudo. A concentração de *P. pastoris* (expressa em UFC/mL) foi determinada por meio de diluição seriada decimal em

solução salina 0,9% estéril e contagens em placas contendo Agar YM, após incubação das placas a 37°C por 24 h.

No grupo PP, os animais foram suplementados diariamente por gavagem contendo 10^8 UFC da levedura/animal e, no grupo C, os animais receberam gavagem com solução salina no intuito de gerar o mesmo nível de estresse. No 17º dia foi realizada a eutanásia, onde os camundongos foram anestesiados com isoflurano e submetidos ao procedimento de exsanguinação por punção cardíaca, seguindo os princípios éticos estabelecidos pelo COBEA (DOU, 2016). Foi efetuada coleta de sangue de todos os animais ao final do estudo, para realização do hemograma completo em laboratório de análises clínicas especializado.

As análises estatísticas foram realizadas no programa Graphpad Prism 6.0 através do teste: Two-way Anova, considerando-se o nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias e desvio padrão do eritrograma podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1: Médias \pm desvio padrão do hemograma de camundongos Swiss machos saudáveis, suplementados diariamente por gavagem por 17 dias com 10^8 UFC/animal de *P. pastoris* (PP); não suplementados, controle (C) e valores de referência (n=29).

Hemograma	Médias dos valores encontrados nos grupos (\pm desvio padrão)		
	Controle	PP	Valor de referência ^β
Leucócitos (cels/mm ³)	2010 \pm 880	3238 \pm 604*	1900-7000
Neutrófilos (cels/mm ³)	192 \pm 111	197 \pm 69	200-800
Linfócitos (cels/mm ³)	1758 \pm 734	2901 \pm 547**	1000-3100
Plaquetas (x10 ² /mm ³)	9114 \pm 2309	10535 \pm 457	3150-7580
Hemácias (x10 ⁶ cels/mm ³)	9,36 \pm 0,40	9,31 \pm 0,15*	5,2-10,4
Hemoglobina (g/dL)	14,70 \pm 0,63	14,65 \pm 0,18*	11,1-14,8
Hematócrito (%)	48,69 \pm 1,93	50,23 \pm 0,54**	32,1-46,5
VCM (fL)	52,03 \pm 1,68	53,98 \pm 1,24	42,2-58,5
CHCM (%)	30,20 \pm 0,69	29,18 \pm 0,43	28,4-38,5

* p<0,05 (Anova); ** p<0,01 (Anova); ^β Santos et al. (2016).

De acordo com SANTOS et al. (2016), os valores de hemácias, hemoglobina, VCM e CHCM encontravam-se dentro da faixa de normalidade. Entretanto, foram observados maiores valores, em ambos os grupos, para o percentual do hematócrito e contagem de plaquetas, além de valores menores de neutrófilos, quando comparado ao estabelecido pela literatura.

CUNHA (2016) avaliou o leucograma de camundongos Swiss machos, imunossuprimidos com ciclofosfamida e suplementados por 17 dias com *P. pastoris* e, observou que a levedura foi capaz de aumentar os níveis séricos dos animais suplementados em comparação àqueles que não receberam a levedura, corroborando com o observado no presente estudo onde a contagem de leucócitos e linfócitos do grupo PP apresentou valores significativamente maiores.

Em estudo realizado com ratos *Wistar* machos, com 28 dias de idade, com uremia induzida por acetaminofeno e suplementação com 10^9 UFC/animal de *Sporosarcina pasteurii* por 21 dias, as concentrações de hemoglobina e a

contagem de hemácias apresentaram-se significativamente maiores do que a do grupo urêmico sem suplementação, equivalendo-se aos níveis do grupo controle. Foi observado ainda, um aumento estatisticamente significativo nos níveis de hemoglobina no grupo tratado apenas com o probiótico, indicando uma ação positiva do *S. pasteurii* no sistema hematopoiético (MANDAL et al., 2013). Dados que corroboram com o presente estudo onde as concentrações plasmáticas de hemácias, hemoglobina e o hematócrito apresentaram-se significativamente maiores no grupo suplementado com a levedura do que no não suplementado (controle), acarretando alterações significativamente positivas entre os animais que receberam a suplementação com *P. pastoris*.

Contudo, tais resultados diferem dos obtidos por ZHOU et al. (2000) que, ao testarem a segurança da utilização das bactérias ácido lácticas *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (10^7 UFC/dia), *L. acidophilus* HN017 (10^9 UFC/dia) e *Bifidobacterium lactis* HN019 (10^{10} UFC/dia), através da ocorrência de efeitos adversos em camundongos BALB/c machos, saudáveis, com 42 dias de idade, com suplementação diária por 30 dias, não observaram quaisquer alterações nas contagens hematimétricas de hemácias, hemoglobina, VCM, plaquetas ou outros parâmetros hematológicos, encontrando-se estes, com valores similares aos encontrados no grupo controle, indicando que as cepas, apesar de seguras, não apresentam benefícios na modulação destes parâmetros.

Os autores observam que estudos com roedores saudáveis não são usuais, sendo estes dados comumente avaliados em suínos, uma vez que, segundo CHIQUIERI et al. (2007), a caracterização destes parâmetros é considerada uma forma indireta de analisar a eficácia de promotores de crescimento.

4. CONCLUSÕES

Além de segura, a suplementação com a levedura *P. pastoris* mostrou-se significativamente benéfica na promoção do aumento dos níveis séricos de leucócitos, linfócitos, hemácias, dosagem de hemoglobina e hematócrito sugerindo sua eficácia como micro-organismo promotor de crescimento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. 2002.
- ÇELIK, E.; OZBAY N. E.; ÇALIK P. Use of Biodiesel Byproduct Crude Glycerol as the Carbon Source for Fermentation Processes by Recombinant *Pichia pastoris*. Industrial & Engineering Chemistry Research, v. 47, p. 2985-2990, 2008.
- CHIQUIERI, J.; SOARES, R. T. R. N.; HURTADO NERY, V. L.; CARVALHO, E. C. Q.; COSTA, A. P. D. Bioquímica sanguínea e altura das vilosidades intestinais de suínos alimentados com adição de probiótico, prebiótico e antibiótico. Revista Brasileira de Saúde e Produção. v. 8, n. 2, p. 97-104, 2007.
- CUNHA, L. R. Efeito da levedura *Pichia pastoris* sobre parâmetros imunológicos e de estresse oxidativo em camundongos Swiss submetidos à quimioterapia com ciclofosfamida. 2016. 99 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de pós-graduação em Nutrição e Alimentos, UFPel.
- DOU. Diário Oficial da União. Resolução Normativa nº 33, de 18 de novembro de 2016. "Procedimentos - Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica" do Guia Brasileiro de Produção,

Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Brasil, 2016.

GABOARDI, G. C.; ALVES, D.R.; GRIEP, E.; RODRIGUES, A.; FINGER, P.; CONCEIÇÃO, F. R. Suplementação de ração para codornas com *Pichia Pastoris* X-33 produzida em resíduos industriais e o impacto no desempenho zootécnico. ANAIS DO IX SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA APLICADA. ISSN 2237-1672. Porto Alegre-RS, 2016.

GIL DE LOS SANTOS, J. R.; STORCH, O. B.; FERNANDES, C. G.; GIL-TURNES, C. Evaluation in broilers of the probiotic properties of *Pichia pastoris* and a recombinant *P. pastoris* containing the *Clostridium perfringens* alpha toxin gene. *Veterinary Microbiology*. n.156, p. 448–451, 2012.

GONZALEZ, F.H.D. O perfil metabólico no estudo de doenças da produção em vacas leiteiras. *Arquivos Faculdade de Veterinária UFRGS*, v. 25. n.2, p.13-33. 1997.

JAIN, N.C. *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, p.19-53, 1993.

MANDAL, A.; MANDAL, S.; ROY, S.; PATRA, A.; PRDHAN, S.; DAS, K.; PAUL, T.; MONDAL, K. C.; NANDI, D. K. Assessment of efficacy of a potential probiotic strain and its antiuremic and antioxidative activities. *e-SPEN Journal*. n. 8, 2013.

MARTINS, F. S.; BARBOSA, F. H. F.; PENNA, F. J.; ROSA, C. A.; NARDI, R. M. D.; NEVES, M. J.; NICOLI, J. R. Estudo do potencial probiótico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* através de testes in vitro. *Revista Biociências* v. 5, n. 2, p. 1–13, 2005.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 42, n. 1, p. 01-16, 2006.

SANTOS, E. W.; OLIVEIRA, D. C.; HASTREITER, A.; SILVA, G. B.; BELTRAN, J. S. O.; TSUJITA, M.; CRISMA, A. R.; NEVES, S. M. P.; FOCK, R. A.; BORELLI, P. Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. *Brazilian Journal Veterinary*. v. 53, n. 2, p. 138-145, 2016.

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

ZHOU, J. S.; SHU, Q.; RUTHERFURD, K. J.; PRASAD, J.; BIRTLES, M. J.; GOPAL, P. K.; GILL, H. S. Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lb. acidophilus* HN017, and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/c mice. *International Journal of Food Microbiology*. n. 56, p. 87–96, 2000.