

Ação imunomoduladora de bactéria probiótica em linhagem celular de macrófagos

**BEATRIZ RIBEIRO TINOCO ESSINGER¹; RENATA NOBRE DA FONSECA²;
HELEN CABALDI FRANZ²; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE²; SILVIA DE
OLIVEIRA HÜBNER³**

¹Universidade Federal de Pelotas – biassing@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – renatanobredafonseca@gmail.com, helencfranz@gmail.com,
fleivasleite@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – silviaohubner@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Probióticos são suplementos com organismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, conferem efeitos benéficos ao indivíduo (FAO/WHO, 2002). Alguns probióticos têm como mecanismo de ação a imunomodulação, agindo, por exemplo, na regulação da produção de anticorpos, ativando macrófagos e linfócitos e modulando a expressão de citocinas (WYNN, 2009). Com base nisso, para o melhor entendimento da interação do probiótico com o sistema imunológico são necessários testes que mimetizem o contato da bactéria com as células que compõem esse sistema.

Como método de avaliação dessa interação, inicialmente, preconiza-se testes *in vitro*, ou seja, que não necessitam da utilização de animais. A via mais comum de administração de probióticos é a via oral e a interação entre a bactéria probiótica e as células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos, torna-se alvo importante de avaliação de imunomodulação (LLEWELLYN AND FOEY, 2017).

O estudo apresentado teve como objetivo avaliar o estímulo da bactéria probiótica *Bacillus toyonensis* em macrófagos da linhagem RAW 264.7 através da quantificação da expressão da interleucina 4 (IL-4) por PCR em tempo real.

2. METODOLOGIA

As células da linhagem RAW 264.7 foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM) e mantidas em estufa a 37°C com 5% CO₂. Para verificar a produção de citocinas, essas células foram estimuladas com células vegetativas, DNA, sobrenadante e esporos do microrganismo *B. toyonensis*, e como controle foi utilizada a concanavalina A.

O *Bacillus toyonensis* foi obtido da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). O microrganismo foi semeado em ágar BHI (Infusão Cérebro e Coração) e incubado a 37°C durante 24 horas. Para obter esporos, o meio líquido de cultura foi vertido em outro meio chamado NYSM, que funciona como sendo restritivo, obrigando as células a esporularem, entrando em um estado de inércia. Estes esporos foram inativados através do uso de autoclave (121°C, 1 atm, 15 min) e banho maria (100°C, 12 h). O DNA da *B. toyonensis* foi extraído utilizando o *kit Wizard® Genomic DNA Purification* de acordo com as recomendações do fabricante e armazenado a uma temperatura de -20°C.

Objetivando medir a expressão da IL-4, foi isolado o RNA total da linhagem RAW 264.7 submetida a diferentes estímulos (*B. toyonensis*, esporos, DNA e sobrenadante de cultura), utilizando o reagente TRIzol™. A partir do RNA total

isolado, foi sintetizado o DNA complementar (cDNA) utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription*, de acordo com as recomendações do fabricante, sendo armazenado a -20°C até o uso.

Foi feita reação em cadeia da polimerase utilizando o kit GoTaq® qPCR Master Mix de acordo com as recomendações do fabricante. Os primers utilizados foram 5' CCAAGGTGCTTCGCATATT 3' (*primer forward*) e 5' ATCGAAAAGCCCGAAAGAGT 3' (*primer reverse*) para IL-4. Os primers apresentaram eficiência de 95,7 % e foram utilizados com temperatura de anelamento de 60°C e 72°C de extensão final. As amostras de RNA para foram padronizadas a 400 ng.

Os resultados foram analisados utilizando o teste estatístico de comparação entre médias de Tukey, considerando um nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta a comparação da expressão de RNA mensageiro de IL-4 por macrófagos da linhagem RAW 264.7 em relação a diferentes estímulos.

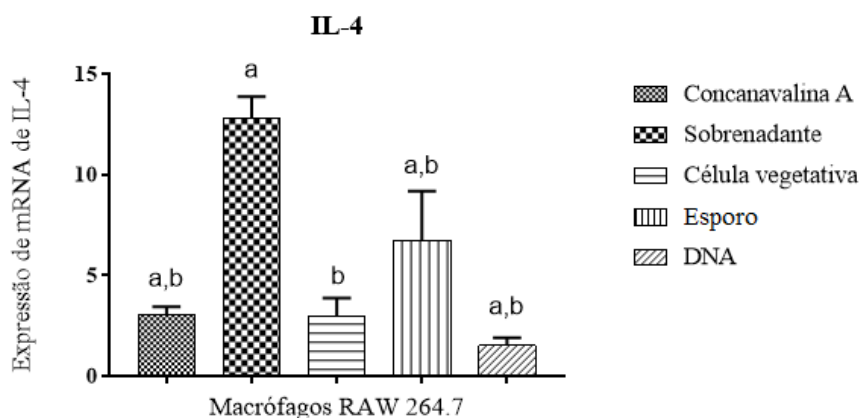


Figura 1. Expressão relativa de IL-4 em células RAW 264.7 sob diferentes estímulos

Conforme demonstrado na Figura 1, os estímulos que apresentaram diferença estatística quando comparados foram o sobrenadante e a célula vegetativa. Ou seja, quando comparados os dois estímulos, as células estimuladas com o sobrenadante do cultivo apresentaram maior expressão de mRNA de IL-4, enquanto as células estimuladas com a célula vegetativa apresentaram menor expressão.

Interleucinas são citocinas produzidas por células especializadas, como os linfócitos e macrófagos, que atuam em sua maioria na modulação das respostas humoral e celular (FLORES, 2007). A IL-4 é uma citocina produzida principalmente por linfócitos T CD4⁺, mas que também é produzida por diversas outras células do sistema imunológico, como, por exemplo, macrófagos. Entre suas funções está a ativação de macrófagos, de modo semelhante ao interferon-gamma (IFN-γ) (ABBAS et al., 2018).

A célula vegetativa é, em suma, a estrutura completa do micro-organismo, ou seja, na prática, seria a maneira através da qual a bactéria entraria em contato com o hospedeiro e, conseqüentemente, com o sistema imunológico. O sobrenadante de uma cultura, quando comparado às células vegetativas dessa cultura, é composto, primordialmente, por componentes do metabolismo celular que são excretados para o meio, além de possuir também nutrientes do meio de

cultura utilizado. Dessa maneira, é sabido que existem compostos de diversas origens compondo o sobrenadante do cultivo e também a célula vegetativa (TORTORA, 2016). Porém, de maneira arbitrária, é possível inferir que a origem dos compostos (ou composto) que esteja estimulando a expressão de IL-4 seja proteica, uma vez que proteínas são macromoléculas com maior potencial antigênico. Para verificar exatamente qual proteína que compõe o sobrenadante que está produzindo efeito estimulante positivo na expressão de IL-4, o ideal seria realizar uma análise proteômica do sobrenadante do cultivo purificado, isolar as proteínas identificadas e utilizá-las como estímulo individualmente em células RAW 264.7.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos é possível inferir que componentes do metabolismo da bactéria, os quais são excretados para o meio, têm capacidade de estimular macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 a aumentar a expressão IL-4. São necessários mais estudos para que sejam identificados quais componentes (proteínas, carboidratos...etc.) presentes no sobrenadante da cultura estão diretamente relacionados com esse estímulo, porém, o conhecimento gerado a partir do teste realizado traz possibilidades para o uso potencial imune estimulante em vacinas, por exemplo, nas quais eles seriam úteis como forma e modulação da resposta imunológica contra o agente alvo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew HH; PILLAI, Shiv. **Cellular and molecular immunology**. Elsevier Health Sciences, 2018.

AVELAR, B. A. **Detecção *in vitro* de citocinas intracitoplasmáticas (interferon gama, fator de necrose tumoral, interleucina 4 e interleucina 10) em leucócitos humanos tratados com extrato bruto diluído de *Euphorbia tirucalli***. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed da UFSM, 2007.

SANTOS, F.D.S. **Avaliação de *Bacillus toyonensis* como bioadjuvante em vacina recombinante**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Sanidade Animal) – Programa de Pós Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas.

TORTORA, Gerard J.; CASE, Christine L.; FUNKE, Berdell R. **Microbiologia-12ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

WYNN, S.G. Probiotics in veterinary practice. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Tennessee, v.234, n.5, p.606-613, 2009.