

Componentes de bactéria probiótica *Bacillus toyonensis* aumentam proliferação de linhagem de macrófagos RAW 264.7

RENATA NOBRE DA FONSECA¹; HELEN CABALDI FRANZ²; NEIDA CONRAD³; LUCAS REICHERT MAUBRIGADES⁴; SILVIA DE OLIVEIRA HUBNER⁵; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – renatanobredafonseca@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – helecfranz@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – conradneida@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – lucasmaubrigades@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – sohubner@yahoo.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Probióticos são micro-organismos vivos, não-patogênicos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (WHO, 2014). Atualmente, probióticos são amplamente utilizados em diversos países na prática clínica e podem ser adquiridos com ou sem prescrição médica. Os micro-organismos com função probiótica mais utilizados pertencem aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, os quais, em muitos casos, são originários da microbiota humana saudável ou de produtos de origem animal (LINARES et al., 2017).

Os principais efeitos dos probióticos a nível intestinal são o equilíbrio e restauro da microbiota, a proteção contra patógenos, a manutenção da integridade da mucosa intestinal e a imunomodulação. A interação entre os probióticos e o sistema imunológico se dá, quando esses são administrados via oral, primeiramente, a nível intestinal através do tecido linfóide associado a mucosa intestinal (folículos e placas de Peyer), que é composto por diversas subpopulações de células como linfócitos T, linfócitos B e macrófagos (ISOLAURI et al., 2001).

Espécies do gênero *Bacillus* têm sido utilizadas como probióticos há mais de 50 anos, porém, o interesse científico em estudar as propriedades probióticas dessa família são mais recentes, tendo iniciado nos últimos 20 anos. Entre as espécies de *Bacillus* mais estudadas estão: *B. subtilis*, *B. clausii*, *B. cereus*, *B. coagulans* e *B. licheniformis* (CUTTING, 2011). A bactéria *Bacillus toyonensis* (previamente classificada como *Bacillus cereus* var. *toyo*) é utilizada com função probiótica aditiva na ração de animais na forma de produto comercial Toyocerin® desde 1975 (KANTAS et al., 2015), entretanto, estudos sobre o seu mecanismo de ação e aplicações são recentes. Dessa maneira o estudo objetivou analisar o efeito de proliferação celular de componentes da bactéria *Bacillus toyonensis* (célula vegetativa, esporos vivo e inativado, DNA e sobrenadante do cultivo) em macrófagos murinos da linhagem celular RAW 264.7.

2. METODOLOGIA

Para realização do ensaio de proliferação celular, células da linhagem RAW 264.7 foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas a 37°C em estufa à 5% de CO₂. O cultivo celular foi plantado em placa de cultivo celular de 96 cavidades (100 µl por cavidade) a uma confluência de 1 x 10⁶ células por mL. O cultivo foi mantido em

estufa por 2 horas com fim de adesão celular à placa. Após esse período foram adicionados os estímulos (100 µl por cavidade): meio MEM, concanavalina A (conA) (2 µl/mL), lipopolissacarídeo (LPS) (1 µl/mL), esporo de *Bacillus toyonensis* inativado (10^6 esporos/mL), esporo de *B. toyonensis* vivo (10^6 esporos/mL), DNA de *B. toyonensis* (25 µl/mL), célula vegetativa de *B. toyonensis* (10^6 células/mL) e o sobrenadante do cultivo de *B. toyonensis* em meio BHI (Infusão Cérebro e Coração) por 24 horas (25 µl/mL). As células foram deixadas em contato com os estímulos durante um período de 24 horas em estufa à 37°C e 5% de CO₂. O meio MEM foi utilizado como controle negativo e a conA e o LPS como controles positivos. Após esse período o sobrenadante foi descartado e foi realizado o ensaio de proliferação celular utilizando a metodologia descrita por SKEHAN et al. (1990) com modificações. O método utilizado é baseado no uso do corante fluorescente sulforodamina B (SRB), que, por sua afinidade à aminoácidos básicos, penetra na célula ligando-se às proteínas produzindo fluorescência, os níveis de proliferação celular são inferidos a partir da avaliação quantitativa da absorbância feita em equipamento espectrofotômetro com comprimento de onda de 530 nm. Os níveis de absorbância refletem os níveis de proteínas celulares que, consequentemente, representam uma forma indireta de avaliação da multiplicação celular.

O *B. toyonensis* foi obtido da coleção de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). O micro-organismo foi semeado em ágar BHI 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. Parte dos esporos obtidos foram inativados através do uso de autoclave (121°C, 1 atm, 15 min). 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.

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

Os cultivos celulares estimulados com esporos de *B. toyonensis* vivos e inativados e também com a célula vegetativa apresentaram maior taxa de proliferação que os grupos controles (conA e LPS), diferindo estatisticamente desses. A maior taxa de proliferação foi obtida quando as células foram estimuladas com esporos de *B. toyonensis* vivos (Figura 1).

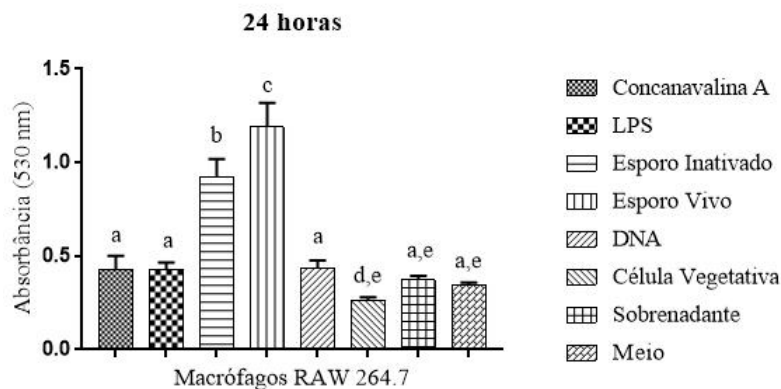


Figura 1. Ensaio de proliferação celular utilizando linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 sob diferentes estímulos. *Letras minúsculas diferentes indicadas acima do desvio padrão de cada barra indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); Letras iguais não diferem entre si.*

Células em multiplicação duplicam as suas macromoléculas e organelas antes de, efetivamente, realizar a divisão celular. Isso implica na síntese de novas proteínas, ou seja, o processo de proliferação está indiretamente ligado ao aumento na produção dessas moléculas (ALBERTS et al., 2017).

A esporulação é característica de alguns gêneros bacterianos e consiste no processo de redução do metabolismo celular, não realizando atividade biossintética e reduzindo a respiração celular a níveis basais, além de não ocorrer multiplicação celular. A medida em que o ambiente se torna favorável (com maior disponibilidade de nutrientes e temperatura ideal, por exemplo) a célula então esporulada pode voltar a seu estado vegetativo (TORTORA et al., 2016). Em relação a estrutura, a célula na forma esporulada pode passar a expressar proteínas e deixar de expressar outras, além disso, a inativação por temperatura de um esporo pode levar à desnaturação de proteínas, o que justificaria a diferença entre o estímulo proliferativo gerado por esporos vivos e inativados.

Macrófagos são células do sistema imunológico inato que possuem receptores para padrões moleculares associados a patógenos (PAMP's), os quais podem ser carboidratos, proteínas, lipídeos ou até mesmo a junção desses últimos como o lipopolissacarídeo (LPS), PAMP presente na parede celular da maioria das bactérias. É, dessa maneira, inespecífica, que macrófagos 'reconhecem' o antígeno e produzem uma resposta contra ele. A indução da proliferação celular atribui ao antígeno a característica de ser 'imunogênico', ou seja, de ser reconhecido e de gerar uma resposta imunológica (ABBAS et al., 2019).

Estudos realizados pelo nosso grupo (SANTOS et al., 2018; ROOS et al., 2012) demonstraram que a administração do *Bacillus toyonensis* ampliou a eficácia da vacina contra o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) em modelos murinos e ovinos, resultados que vão ao encontro aos obtidos neste trabalho, sendo a indução da proliferação de macrófagos um dos mecanismos de realização do incremento da resposta imunológica gerada por esse probiótico.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos é possível inferir que componentes presentes nos esporos vivo e inativado de *B. toyonensis* têm capacidade de estimular a proliferação de macrófagos murinos (RAW 264.7) revelando seu potencial imunomodulador. Para identificar quais são os componentes que estão diretamente relacionados ao estímulo mais estudos são necessários.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. Brasil: Elsevier, 2019.

ALBERTS, Bruce et al. **Biologia molecular da célula**. Brasil: Artmed Editora, 2017.

CUTTING, Simon M. Bacillus probiotics. **Food microbiology**, v. 28, n. 2, p. 214-220, 2011.

ISOLAURI, Erika et al. Probiotics: effects on immunity. **The American journal of clinical nutrition**, v. 73, n. 2, p. 444s-450s, 2001.

KANTAS, D. et al. A feed additive containing Bacillus toyonensis (Toyocerin®) protects against enteric pathogens in postweaning piglets. **Journal of applied microbiology**, v. 118, n. 3, p. 727-738, 2015.

LINARES, Daniel M. et al. Lactic acid bacteria and bifidobacteria with potential to design natural biofunctional health-promoting dairy foods. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 846, 2017.

ROOS, Talita Bandeira et al. The immune modulation of Bacillus cereus var. Toyoi in mice immunized with experimental inactivated Bovine Herpesvirus Type 5 vaccine. **Vaccine**, v. 30, n. 12, p. 2173-2177, 2012.

SANTOS, F. D. S. et al. Bacillus toyonensis improves immune response in the mice vaccinated with recombinant antigen of bovine herpesvirus type 5. **Beneficial microbes**, v. 9, n. 1, p. 133-142, 2018.

SKEHAN, Philip et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

TORTORA, Gerard J.; CASE, Christine L.; FUNKE, Berdell R. **Microbiologia**. Brasil: Artmed Editora, 2016.