

EFEITO IMUNOMODULADOR *IN VITRO* DE *LACTOBACILLUS CASEI* P054 ORIUNDO DO COLOSTRO E SILAGEM DE COLOSTRO BOVINO

CAROLINA LITCHINA BRASIL¹; VITÓRIA SEQUEIRA GONÇALVES²;
CAROLINE QUINTANA BRAGA²; MARA SAALFELD³; FABIO PEREIRA LEIVAS
LEITE⁴; DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA⁴.

¹Universidade Federal de Pelotas 1 – carolinalitchinabrasil@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas

³Emater/RS

⁴Universidade Federal de Pelotas –danielabrayer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A primeira secreção láctea por ocasião do parto é denominada colostrum e constitui-se na única fonte de transferência de anticorpos nos bovinos (KURALKAR E KURALKAR, 2010). Uma das mais importantes funções do colostrum é fornecer proteção imunológica e nutrição adequada para o recém-nascido (GODDEN, 2009). Além disso, outra importante função e utilização do colostrum em países desenvolvidos é a suplementação alimentar para humanos imunocomprometidos, como produto medicinal e como suplemento alimentar para atletas (GODHIA; PATEL, 2013).

A fermentação anaeróbica do colostrum bovino (silagem de colostrum) foi descrita por Saalfeld (2008) como uma opção de aproveitamento do excesso de colostrum produzido nas propriedades rurais. A silagem de colostrum possibilita o armazenamento do colostrum, não necessitando de refrigeração, congelamento ou incrementos. É uma forma econômica de se obter um substituto do leite e colostrum, apresentando boa qualidade nutricional para bovinos em aleitamento (SAALFELD et al., 2013).

A literatura afirma que a silagem de colostrum mantém as características físicas e químicas encontradas no colostrum *in natura*, bem como a presença de micro-organismos e outros constituintes colostrais (SAALFELD et al., 2013, VIRGINIO et al., 2016). Saalfeld et al. (2016) verificaram que há manutenção de bactérias ácido lácticas (BAL), principalmente do gênero *Lactobacillus* que, através da produção de compostos ácidos, inibem o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos.

Lactobacillus está incluído no grupo das BAL e é reconhecido como micro-organismo probiótico, ou seja, uma bactéria que quando administrada viva em quantidade adequada promova benefícios à saúde do hospedeiro (HILL et al., 2014). Segundo a FAO/WHO (2002) os requisitos mínimos para um microrganismo ser probiótico incluem a avaliação de sua identidade, testes *in vitro* que demonstrem a sobrevivência pelo trato gastrointestinal; modulação na resposta imune humoral ou celular; avaliação de segurança e por fim, estudos *in vivo* que comprovem os efeitos benéficos na saúde do hospedeiro.

Os mecanismos de ação responsáveis pelos benefícios dos probióticos não estão totalmente elucidados. Os principais mecanismos propostos incluem a modulação do sistema imunológico, a alteração da microbiota intestinal, o fortalecimento da barreira epitelial do intestino, inibição da adesão de patógenos,

exclusão competitiva de microrganismos patogênicos e a produção de substâncias antimicrobianas (BERMUDEZ; BRITO et al., 2012).

Tendo em vista a importância da utilização da silagem de colostro bovino na alimentação animal entende-se que a continuidade das pesquisas com colostro bovino é extremamente relevante para elucidar e difundir os benefícios desse produto como alimento. O presente trabalho tem como objetivo avaliar um dos propostos mecanismos de ação dos probióticos: capacidade de imunomodulação *in vitro* do *Lactobacillus casei* P054 oriundo de colostro e silagem de colostro bovino.

2. METODOLOGIA

Para avaliação da imunomodulação *in vitro*, foram utilizadas placas de 24 poços (Kasvi – modelo K12-024) para cultivar células originárias de esplenócito bovino, segundo protocolo de Dummer et al. (2014). Tanto o cultivo celular como o qPCR foram realizados em duplicata com distintos esplenócitos originados de dois animais.

As células foram estimuladas a partir de 20 horas de cultivo em meio RPMI com 10µg de *Lactobacillus casei* P054 oriundo do colostro e silagem de colostro bovino, na concentração de 10⁶ UFC. Cinco µg de concanavalina A foi utilizada como controle positivo e somente meio de cultura, como controle negativo. Após 24 horas de estímulo com o *L. casei* P054, o sobrenadante foi coletado e armazenado e as células foram armazenadas em Trizol®. Posteriormente o mRNA celular foi extraído segundo protocolo do fabricante e armazenados a -70 °C. O mRNA resultante serviu de molde para síntese de cDNA utilizando KitHigh Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

A análise da transcrição relativa de mRNA de citocinas pró-inflamatórias frente ao estímulo com *L. casei* P054 foram quantificadas por meio de qPCR (Mx30005P QPCR System - Agilent Technologies). A reação foi realizada com temperatura de desnaturação a 95°C, anelamento a 60°C e extensão a 72°C. Os oligo iniciadores utilizados nas reações foram: β actina, IL 2, IL 4, IL 10, IL 17 e INF-γ. Para cada amostra, o valor de Ct (*threshold cycle*) foi obtido pelo qPCR e a expressão relativa foi calculada usando a expressão descrita por Livak e Schmittgen (2001).

A expressão foi analisada usando Multi Experimental Viewer (MeV), EASE Expression Analysis Systematic Explorer Ver. 4.6, e apresentando o diagrama de cor usando o controle 0 como calibrador. As reações foram realizadas em triplicatas e repetidas duas vezes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os níveis de transcrição das citocinas estão demonstrados na figura 1. Com base nos dados, pode-se observar que o probiótico testado foi capaz de estimular a transcrição relativa de mRNA de interleucina 2, 4, 10, e 17.

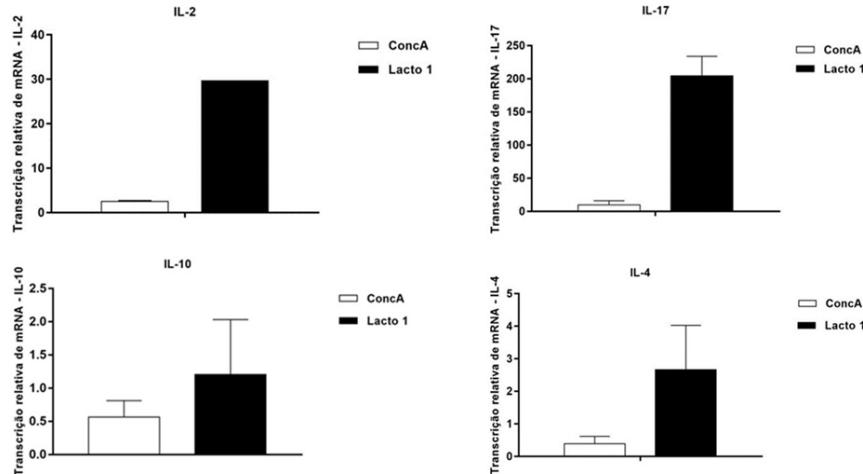


Figura 1: Transcrição relativa de mRNA de *Lactobacillus casei* P054. Resultados de qPCR expressos em níveis de transcrição de RNA mensageiro. O estímulo com *L. casei* P054 aumentou os níveis de transcrição do mRNA de IL-2, IL-10, IL-17 e IL-4 em células de esplenócito bovino.

Os efeitos dos probióticos na modulação da resposta imune dependem do micro-organismo utilizado (HERICH & LEVKUT, 2002). Sabe-se que *Lactobacillus* spp. estimulam células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de humanos a produzirem várias citocinas pró-inflamatórias, tais como: IL-10, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e IFN- γ , e TGF- β que estimulam o desenvolvimento de perfis de respostas imunes distintas (SOLIMAN et al., 2015). Em nosso estudo foi possível observar alta expressão de IL-10, que é reconhecidamente importante sua estimulação, devido sua ação em doenças alérgicas.

A alta expressão de IL-2 demonstrada em nosso estudo vem de encontro com o descrito por Kleniewska et al. (2016). A produção de IL-2 está relacionada as bacteriocinas, que são produzidas a partir de componentes protéicos dos *Lactobacillus*, são capazes de exercer ação local semelhante aos antibióticos contra organismos patogênicos e de diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL- 2.

Segundo Castillo et al. (2016) a administração oral de *Lactobacillus* foi capaz de modular a secreção de IL- 4 melhorando a resposta immune de camundongos em afecções de trato respiratório. Dessa forma, sugere-se que a transcrição elevada de IL – 4 revelada em nossa pesquisa pode valer na administração oral de silagem de colostro bovino podendo apresentar melhora na resposta imune frente a essas afecções.

Conforme Chen et al. (2015) a utilização de *Lactobacillus* atenuou significativamente a expressão de IL-17 em casos de colite experimental, apresentando resultados superiores no tratamento quando comparado a utilização terapeutica medicamentosa. No presente estudo, a expressão elevada de IL- 17 nos leva a acreditar que podemos obter resultados semelhantes ao estudo citado.

Os resultados encontrados no presente estudo são importantes, visto que o isolado apresentou expressões altas de interleucinas amplamente reconhecidas em estudos envolvendo probióticos.

4. CONCLUSÕES

É possível inferir que *Lactobacillus casei* P054 presente no colostro e na silagem de colostro apresenta atividade imunomoduladora *in vitro*. A presente pesquisa vem complementar os prévios estudos que mostraram os benefícios do emprego da silagem de colostro bovino para alimentação animal. Adicionalmente, espera-se que ao final do período de estudo, os resultados obtidos sirvam de alavanca para a difusão e para amenizar o preconceito com relação ao uso do colostro bovino na alimentação humana, bem como vem corroborar com os benefícios do emprego da silagem de colostro bovino na alimentação animal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- PRIESTLEY, D.; BITTAR, J. H.; IBARBIA, L.; RISCO, A. A.; GALVÃO, K. N. Effect of feeding maternal colostrum or plasma-derived or colostrum-derived colostrum replacer on passive transfer of immunity, health, and performance of preweaning heifer calves. *J. Dairy Sci.*, v.96, c.5, p. 3247-3256, 2013.
- BRASIL, C.L.; JUNIO S.G.S.A.; PAZINATO, F.M; VALENTE, J.S; ZAMBRANO, C.G; ETGES, J.P.H.; NOGUEIRA, C.E.W. Colostro equino: importância dos principais constituintes físico-químicos. *Revista Brasileira de Medicina Equina*, v. 12, p. 4-11, 2017.
- FOLEY, J. A.; OTTERBY, D. E. Availability, storage, treatment, composition, and feeding value of surplus colostrums. *J. Dairy Sci.*, v.61, p.1033-1060, 1978.
- SAALFELD, H. M.; PEREIRA, B. I. D.; SILVEIRA, K. R. K.; SCHRAMM, R.; VALENTE, S. S. J.; BORCHARDT L. J.; GULARTE, A. M.; LEITE, L. P. F. Anaerobically fermented colostrum: an alternative for feeding calves. *Ciência Rural*, v.43, n.9, p.1636-1641, 2013.
- SAALFELD, M. H. Uso da silagem de colostro como substituto do leite na alimentação de terneiras. *A Hora Veterinária*, n.162, p.59-62, 2008.
- SAALFELD, M. H.; PEREIRA, D. I. B.; SILVEIRA, K. R. K.; DINIZ, G. L.; KRINGEL, D. H.; ALVES, M. I.; GULARTE, M. A.; LEITE, F. P. L. Colostro: A redescoberta de um alimento saudável, nutritivo e com potencial probiótico. *Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável*, v.5, n.2, p.18-24, 2012.
- BATISTA, G.N.; MOREIRA, P.S.A.; OLIVEIRA, L.T.; ROSA, C.C.B.; POLIZEL NETO, A. Avaliação do tempo de armazenamento e composição da silagem de colostro entre duas raças leiteiras: Girolando e Jersey. *Sci. Elec. Arch.*, v. 9, n. 2, p. 10-16, 2016.
- DUMMER, L.A., ARAUJO, I.L., FINGER, P.F., DOS SANTOS, A.G., DA ROSA, M.C., CONCEIÇÃO, F.R., FISCHER, G., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. & LEITE, F.P.L. Immune responses of mice against recombinant bovine herpesvirus 5 glycoprotein D. *Vaccine*. 32(21). p. 2413–2419, 2014.
- LIVAK, K.J. & SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods*. 25. p. 402–408, 2001.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., Gil, A., Probiotic Mechanisms of Action. *Ann. Nutr. Metab.* 61, 160-174, 2012.
- Castillo, P., Kolls, J.K., IL-10: A Paradigm for Counterregulatory Cytokines. *J. Immunol.* 197, 1529-1530, 2016.
- MATSUZAKI, G. IL-17A Produced by $\gamma\delta$ T Cells Plays a Critical Role in Innate Immunity against *Listeria monocytogenes* Infection in the Liver1. *Journal of immunology*. 181(5). p. 3456–3463, 2008.