

Influência do consumo de *Lactobacillus rhamnosus* nos níveis séricos de IgG e na contagem de leucócitos de ratos SPF recém desmamados

Influence of Lactobacillus rhamnosus consumption on IgG levels and leukocyte counts of weaned SPF rats

Jaime Guimarães Narcizo ¹; Luciana Cauduro Ximenez ²; Tânia Cristina Sumita ¹; Silvana Soléo Ferreira dos Santos ¹; Célia Regina Gonçalves e Silva ¹; Mariella Vieira Pereira Leão ^{1,3}

¹ Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Universidade de Taubaté – UNITAU, Taubaté – SP

² Biotério da Universidade de Taubaté – UNITAU, Taubaté – SP

³ Autor para correspondência (*Author for correspondence*): mariella.leao@unitau.com.br

Resumo

Os alimentos probióticos têm efeitos imunoestimulantes em animais e no homem, entretanto seu mecanismo de ação ainda não foi esclarecido. Nesse sentido, o presente trabalho objetivou avaliar o influência de *Lactobacillus rhamnosus*, uma espécie bacteriana com propriedades probióticas, na contagem de leucócitos e nos níveis séricos de IgG de ratos SPF (livres de patógenos específicos) recém desmamados. Foram estudados 24 ratos Wistar machos, com 20-21 dias, que foram separados em dois grupos: um grupo que consumiu uma suspensão de *L. rhamnosus* (105 células/mL), por um período de 30 dias; e um grupo controle (sem consumo do probiótico). Os animais foram então anestesiados e amostras de sangue foram obtidas por via intracardiaca. As amostras foram transferidas para tubos secos para obtenção do soro, no qual foram analisados os níveis de IgG pela técnica ELISA; e tubos com anticoagulante, para imediata contagem de leucócitos, utilizando contador automatizado. Foi observado que os animais que consumiram *L. rhamnosus* apresentaram média de contagens totais de leucócitos semelhantes ao grupo controle. Em relação aos níveis de IgG séricas, também não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. Assim, os resultados sugerem que o consumo de *L. rhamnosus* não influenciou significativamente na quantidade de células imunes e anticorpos presentes no sangue de ratos SPF recém-desmamados.

Palavras-chave: probióticos, anticorpo, células do sistema imune.

Abstract

The immunostimulatory effects of probiotics have been observed in animals and humans, however their mechanisms of action have not been elucidated yet. This way, the present study aimed to verify the influence of *Lactobacillus rhamnosus*, a bacterial species with probiotic properties, on leukocyte counts and levels of IgG in the sera of weaned SPF (specific pathogen free) rats. It was studied 24 male Wistar rats, at the age of 20-21 days, that were separated into two groups: a group that received a suspension of *L. rhamnosus* (ATCC1465) (105 cells/mL), for a period of 30 days; and a control group. After this period, the animals were anesthetized and blood samples were obtained by intracardiac technique. The samples were transferred to test tubes to obtain serum, for analysis of IgG levels using ELISA technique; and to test tubes containing anticoagulant, for immediate counting of leukocytes, using automatic counter. It was observed that the blood of the animals who consumed *L. rhamnosus* showed similar mean of leukocytes counts with the control group. Regarding the levels of serum IgG, it was also observed no statistically significant differences between both groups. Thus, the results suggest that the consumption of *L. rhamnosus* did not significantly influence the amounts of immune cells and antibodies presented in the blood of weaned SPF rats.

Keywords: probiotics, antibody, immune cells.

INTRODUÇÃO

Os alimentos probióticos parecem estimular a resposta imune específica e não-específica segundo estudos realizados *in vitro*, em animais e em humanos (Hoolihan, 2001; Calder & Kew, 2002). Os probióticos podem influenciar a imunidade sistêmica, estimulando a produção de IgG, além da estimulação da produção de IgA secretória no intestino, que poderiam impedir a

aderência de bactérias patogênicas (Ferreira *et al.*, 1998). Segundo Cross (2002), os probióticos favorecem a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos e a secreção de mediadores que estimulam o sistema imunológico, sendo que esse efeito benéfico dos probióticos ocorre sem o desencadeamento de uma resposta inflamatória prejudicial ao organismo (Hoolihan, 2001;

Calder & Kew, 2002).

Tem sido observado (Kato *et al.*, 1983; Perdígón & Alvarez, 1992) aumento da capacidade fagocítica de macrófagos peritonias e das atividades das enzimas envolvidas nesse evento com a administração de lactobacilos. Shu & Gill (2002) estudaram a influência de *Lactobacillus rhamnosus* em camundongos infectados com *Escherichia coli* O157: H7, comprovando que esta bactéria probiótica estimula a atividade fagocítica e ainda promove aumento nos níveis de anticorpos específicos.

Contagens elevadas de células secretoras de IgA e IgM circundantes foram observadas em recém-nascidos colonizados por *Bacteroides fragilis* e *Bifidobacterium* spp, sugerindo que esta colonização pode estar relacionada com a maturação dos mecanismos de imunidade humoral. Esse fato comprova que a microbiota intestinal é muito importante para a imunorregulação e que diferenças na sua composição podem modificar a homeostase imunológica do indivíduo (Isolauri *et al.*, 2004).

Uma vez que a literatura sugere que o uso frequente de probióticos em humanos e animais confere benefícios por mecanismos ainda não totalmente definidos, o presente trabalho objetivou verificar o influência de células viáveis de *L. rhamnosus*, na contagem de leucócitos e nos níveis séricos de IgG de ratos SPF (*Specific Pathogen Free*) recém desmamados.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Local (CEUA/UNITAU nº 016/12) e foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Animais

Foram estudados 24 ratos Wistar machos,

SPF, recém-desmamados, com 20-21 dias, provenientes do Biotério da Universidade de Taubaté/UNITAU. Os ratos foram mantidos em ambiente controlado (Rack ventilada) durante todo experimento. As trocas dos animais foram realizadas em fluxo laminar e todo material de contato com os mesmos foi autoclavado, para que não houvesse contaminação. Os animais foram separados em dois grupos (n=12): sem consumo de probiótico (grupo controle) e com consumo de probiótico (grupo experimental).

Preparo das suspensões de *Lactobacillus rhamnosus*

Cepa padrão da espécie *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC1465) foi semeada em Ágar Man-Rogosa-Shape (MRS- Oxoid, Basingstroke, Hampshire, England) e cultivadas a 37°C em 5% de CO² por 48h. Após este período, a partir das colônias isoladas e confirmadas pela coloração de Gram foram coletadas alíquotas, com auxílio de uma alça de platina, que foram suspensas em PBS esterilizado até a concentração de 10⁷ células/mL, padronizado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 530 nm.

Uso do probiótico

Os animais do grupo probiótico receberam a suspensão de *Lactobacillus rhamnosus* diluída 1:100 na água de beber, ou seja, na concentração aproximada de 10⁵ células/mL, por um período de 30 dias. A água era trocada diariamente, e novas suspensões eram preparadas a cada 3 dias, da mesma forma relatada anteriormente, e mantidas a 4°C. Os animais do grupo controle receberam somente PBS esterilizado no lugar da suspensão de lactobacilos.

Sangramento dos animais

Após o período de 30 dias, os animais foram sedados com Tiopental sódico (50mg/kg), a sedação foi confirmada, e a coleta de sangue foi realizada.

As amostras de sangue foram obtidas por via intracardiaca, por meio da introdução intercostal de uma agulha em seringa de 5 ml, até atingir o coração. As amostras foram transferidas para tubos secos, para posterior retração do coágulo e obtenção do soro após centrifugação a 1300g. As amostras também foram transferidas para tubos com anticoagulante (EDTA 1,8mg/mL), para imediata contagem de leucócitos.

Após a coleta do sangue, foi realizada a eutanásia dos animais utilizando sobredose do mesmo anestésico.

Contagem de leucócitos

Os tubos contendo as amostras de sangue com anticoagulante foram enviados para um Laboratório de Análises Clínicas particular, que realizou a contagem de leucócitos em contador automático de células, modelo Coulter AcT-8. Às amostras foi adicionado líquido de Turk, para lise das hemácias e contagens totais e diferenciais de leucócitos.

A contagem automática realizada foi confirmada por meio de contagem total, em câmara de Neubauer, e confecção de lâminas com esfregaços sanguíneos para contagem diferencial dos leucócitos.

Análise de IgG

As IgG foram quantificadas pelo método de ELISA. As placas de 96 orifícios foram sensibilizadas com anti-IgG de rato (Goat Anti-Rat IgG-HRP; Southern Biotech) diluída 1:4000 em tampão Carbonato Bicarbonato 0,1 M. As amostras de soro foram diluídas a 1:20 e foram analisadas em duplicata. Foi utilizado conjugado anti-IgG marcado com peroxidase na diluição 1:2000. A revelação da reação foi realizada utilizando solução contendo tampão citrato-ácido cítrico 0,1M, 0,2% de peróxido de hidrogênio e ortofenilenodiamino 400uM (Sigma-Aldrich, USA), e bloqueada com ácido sulfúrico 1N. As leituras das densidades

ópticas foram obtidas em leitor de ELISA, no comprimento de onda de 490nm.

Análise estatística

Os resultados obtidos no presente trabalho foram comparados utilizando o teste *t student*, com nível de significância menor que 5%.

RESULTADOS

Os resultados demonstrados na figura 1 demonstraram que os animais que tiveram na sua dieta a complementação com *Lactobacillus rhamnosus* apresentaram contagens totais médias de leucócitos estatisticamente semelhantes ao grupo controle ($P=0,158$).

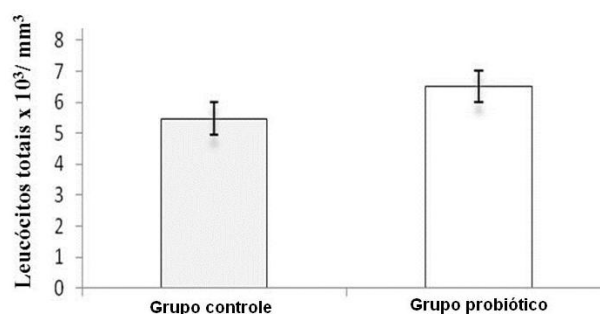


Figura 1. Média das contagens de leucócitos totais por mm³ de sangue dos animais controle e animais tratados com a suspensão de *Lactobacillus rhamnosus*.

Figure 1. Average counts of total leukocytes per mm³ of blood from control animals and animals treated with the suspension of *Lactobacillus rhamnosus*.

Com relação às contagens diferenciais, também não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes ($p<0,05$). Os leucócitos mais abundantes foram os linfócitos e, na Figura 2, pode ser observado que a média das porcentagens dessas células nos ratos que receberam a suspensão probiótica apresentou semelhança estatística à média dos ratos controle ($P=0,528$).

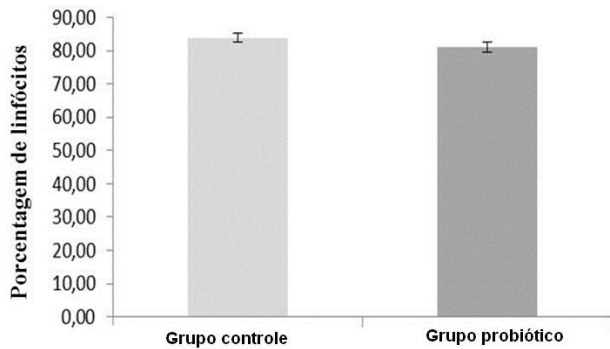


Figura 2. Média da porcentagem de linfócitos encontrados no sangue dos ratos SPF, controle e tratados com suspensão de *Lactobacillus rhamnosus*.

Figure 2. Mean percentage of lymphocytes found in the blood of SPF rats, control and treated with suspension of *Lactobacillus rhamnosus*.

Os resultados das densidades óticas, após a realização da técnica ELISA, para comparação dos níveis de IgG séricas nos grupos estudados também demonstrou que o grupo que fez uso de probiótico apresentou níveis desta imunoglobulina semelhantes ao grupo controle ($P=0,182$) (Figura 3).

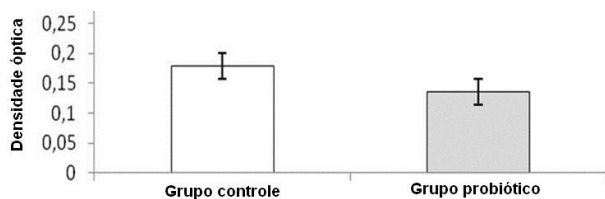


Figura 3. Média da densidade óptica, referente aos níveis de IgG séricas dos animais controle e animais tratados com a suspensão de *Lactobacillus rhamnosus*.

Figure 3. Average optical density related to the serum IgG levels for control animals and animals treated with the suspension of *Lactobacillus rhamnosus*.

DISCUSSÃO

Embora a literatura tenha demonstrado que o consumo de probióticos estimula a resposta imunológica e a produção de anticorpos (Hoolihan, 2001; Calder & Kew, 2002; Cross, 2002), no presente estudo não foram observados resultados que indiquem um aumento no sistema de defesa de animais SPF recém-desmamados. As contagens de leucócitos totais apresentaram-se estatisticamente semelhantes entre o grupo que fez uso de probiótico e o grupo controle.

Resultados semelhantes foram encontrados por Budiño et al. (2004), estudando leitões desmamados alimentados com probióticos e prébióticos. Foram encontradas contagens semelhantes de leucócitos nos grupos experimentais e controle, entretanto com valores mais elevados que os valores de referência para idade. Os autores atribuíram esta elevação à secreção aumentada de catecolaminas devido ao stress provocado pelo desmame.

Os ratos do presente estudo apresentaram contagens de médias de leucócitos de 6×10^3 células/mm³ de sangue, sendo que em animais adultos esta contagem se apresenta com uma média de 9,4 a $6,4 \times 10^3$ células/mm³ de sangue (Dantas et al., 2006). Portanto, diferente dos autores mencionados acima, os animais estudados, tanto do grupo controle como do grupo tratado, apresentavam contagens de leucócitos semelhantes, e até inferiores, às de um animal adulto normal.

Variações nas contagens de leucócitos de animais saudáveis podem ocorrer em função de diferentes fatores, como idade, local de coleta e metodologia de contagem. Em geral, contagens de amostras obtidas a partir do coração, como a utilizada no presente trabalho, se apresentam significativamente menores que aquelas obtidas por via retro ocular ou pela cauda do animal (Nemzek et al., 2001). O fato de pertencerem à linhagem SPF e serem recém-desmamados também pode ter contribuído para o encontro de contagens discretamente inferiores de leucócitos, uma vez que estes animais ainda eram imunologicamente imaturos e possuíam menos estímulos para produção de células de defesa. Os animais estudados viviam em ambiente controlado, e assim, a possibilidade de ocorrência de leucocitoses ou leucopenias em função da presença de patógenos foi evitada em nosso experimento, aumentando a confiabilidade a cerca dos efeitos do tratamento com probiótico.

Embora as suspensões probióticas utilizadas

contivessem *Lactobacillus rhamnosus* viáveis, esses micro-organismos normalmente não invadem os tecidos, permanecendo somente nas mucosas, onde pode impedir a colonização e conseqüentemente invasão dos patógenos. Assim, a presença dos mesmos nas mucosas oral ou intestinal pode não ter sido suficiente para influenciar a contagem sérica dos leucócitos e promover diferenças significativas entre os grupos estudados. Embora não tenha sido verificado no presente estudo, o consumo de probiótico poderia ter influenciado a competência de células de defesa sanguíneas ou teciduais frente a desafios microbianos. De fato, alguns estudos apontam para a melhoria da capacidade fagocítica dos macrófagos e da atividade das enzimas envolvidas na fagocitose (Kato et al., 1983; Perdígón & Alvarez, 1992), e da atividade das células *natural killer* (Kato et al., 1984).

Também não foram encontradas modificações significativas nos níveis de imunoglobulinas séricas, da classe IgG. Estes resultados diferem do que vem sendo observado na literatura, que relata aumentos nos níveis de imunoglobulinas em animais e humanos que fazem uso de alimentos probióticos (Isolauri et al., 2004). A produção de anticorpos está condicionada ao estímulo antigênico, e como os micro-organismos probióticos se estabelecem nas mucosas, e não invadem nem produzem danos aos tecidos, somente a estimulação antigênica local pode ter acontecido, e conseqüentemente a síntese de imunoglobulinas séricas pode não ter sido influenciada. De fato, muitos trabalhos da literatura que verificaram aumento da imunidade humoral, encontraram mais elevação de IgA nas mucosas após o consumo de probióticos (Corthier et al., 1992; Rodrigues et al., 1996; Mendonça et al., 2012).

Também é importante ressaltar que grande parte das IgGs séricas destes animais é de origem materna, já que os anticorpos desta classe são transferidos passivamente ao feto através da placenta. Com o passar dos dias, as IgGs materna

são degradadas e o próprio animal passa a produzir seus próprios anticorpos, passando até mesmo por um período de hipogamaglobulinemia transitória (Rego, 2004). Assim, uma vez que as mães não fizeram o consumo de probióticos, mas somente os animais recém-desmamados, o período estudado pode ter sido insuficiente para observação dos efeitos sobre a própria produção de imunoglobulinas.

O presente estudo foi realizado com animais saudáveis, que não foram desafiados com nenhum patógeno, no qual nem a imunidade das mucosas nem a competência dos componentes imunológicos foram investigados. Assim, embora os resultados não tenham demonstrado elevações nas quantidades de componentes celulares ou humorais séricos no sistema imunológico destes animais, diferentes benefícios na imunidade tem sido comprovados com o consumo de alimentos probióticos.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho sugerem que o consumo de *L. rhamnosus* não influenciou significativamente na contagem de leucócitos, bem como nos níveis de IgG séricos de ratos SPF recém desmamados.

REFERÊNCIAS

- BUDIÑO, F.E.L.; THOMAZ, M.C.; KRONKA, R.N.; PIZAURO JÚNIOR, J.M.; SANTANA, Á.E.; TUCCI, F.M.; FRAGA, A.L.; SCANDOLERA, A.J.; HUAYNATE, R.A.R. 2004. Influência da adição de probiótico e/ou prebiótico em dietas de leitões desmamados sobre as atividades das enzimas digestivas e parâmetros sanguíneos. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 26 (4): 529-536.
- CALDER, P.C.; KEW, S. 2002. The immune system: a target for functional foods? *British Journal of Nutrition*, 88: 165-176.
- CORTHIER, G.; LUCAS, R.; JOUVERT, S.; CASTEX, F. 1992. Effect of oral *Saccharomyces boulardii*, treatment on the activity of *Clostridium difficile* toxins in mouse digestive tract. *Toxicon*. 30 (12):1583-1589.

- CROSS, M.L. 2002. Microbes versus microbes: Imune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 34 (4): 245-253.
- DANTAS, J.A.; AMBIEL, C.R.; CUMAN, R.K.N.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, C.A. 2006. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum Health Science**, 28: 165-170.
- FERREIRA, A. G. P.; FERREIRA, C. A.; PETRELLA NETO, R.; OLIVEIRA, D. R.; NUREMBERGER JÚNIOR, R.; LOPES, V. C. B. A. 1998. Probiotes: benefits and efficiency in poultry production. **Arquivos do Instituto Biológico**, 65: 139-149.
- HOOLIHAN, L. K. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics. 2001. **Journal of American Diet Association**, 110: 229-241.
- ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C. Probiotics. 2004. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, 18 (2): 299-313.
- KATO, I.; YOKOKURA, T.; MUTAI, M. Macrophage activation by *Lactobacillus casei* in mice. 1983. **Microbiology and Immunology**, 27 (7): 611-618.
- KATO, I.; YOKOKURA, T.; MUTAI, M. 1984. Augmentation of mouse natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* and its surface antigens. **Microbiology and Immunology**, 28 (2): 209-217.
- MENDONÇA, F.H.B.P.; SANTOS, S.S.F.; FARIA, I.S.; SILVA, C.R.G.; JORGE, A.O.C.; LEÃO, M.V.P. 2012. Effects of probiotics bacteria on *Candida* presence and IgA anti-*Candida* in the oral cavity of elderly. **Brazilian Dental Journal**, 23: 534-538.
- NEZMEK, J.A.; BOLGOS, G.L.; WILLIAMS, B.A.; REMICK, D.G. 2001. Differences in normal values for murine white blood cell counts and other hematological parameters based on sampling site. **Inflamm. res.** 50:523-527.
- PERDIGON, G.; ALVAREZ, S. 1992. Probiotics and the immune state. In: Fuller R. **Probiotics: the scientific basis**. London: Chapman e Hall, p.145-180.
- REGO, J.D. 2004. **Aleitamento Materno**. Rio de Janeiro: Atheneu.
- RODRIGUES, A.C.; NARDI, R.M.; BAMBIRRA, E.A.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R. 1996. Effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* in conventional and gnotobiotic mice. **Journal of Applied Bacteriology**, 81 (3): 251-256.
- SHU, Q.; GILL, H.S. 2002. Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20ã) against *Escherichia coli* O157: H7 infection in mice. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 34 (1): 59-64.

Recebido em 25 julho 2013. Aprovado em 26 de junho de 2014.