

RESISTÊNCIA AO TRATO GASTROINTESTINAL DE CAMUNDONGOS DOS PROBIÓTICOS *Sacharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *toyoi* CO-ADMINISTRADOS

CASTELLI, Regina Maria^{1,2}; SANTOS, Marina^{1,3}; SILVA, Wladimir Padilha²; CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo¹;

MOREIRA, Ângela Nunes^{1,3}.

¹Laboratório de Imunologia Aplicada, Cenbiot/CDTec – UFPel; ²Laboratório de Microbiologia de Alimentos, DCTA/FAEM – UFPel; ³Faculdade de Nutrição – UFPel - Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900, remcastelli@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

Probióticos são micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas produzem efeitos benéficos ao hospedeiro. Estes micro-organismos são usados na prevenção e tratamento de doenças, como promotores de crescimento, como imunoestimulantes e podem ser utilizados como uma alternativa à utilização de antibióticos na alimentação animal, pois não deixam resíduos nos alimentos (COPPOLA, 2004).

Vários micro-organismos são usados como probióticos, entre eles bactérias ácido-lácticas, bactérias não ácido-lácticas e leveduras. Para apresentar potencial probiótico o micro-organismo deve ser inócuo, manter-se viável por longo tempo durante a estocagem e transporte, tolerar o baixo pH do suco gástrico, resistir a ação da bile e das secreções pancreáticas e intestinais e não transportar genes transmissores de resistência a antibióticos, assim como resistir a fagos e ao oxigênio (HOLZAPFEL & SHILLINGER et al., 2000)

Bacillus cereus var. *toyoi* é uma estirpe de *B. cereus* isolada do solo que não produz enterotoxinas diarréicas ou eméticas (WILLIAMS et al., 2009). Este bacilo possui a capacidade de esporular, o que aumenta sua sobrevivência durante o trânsito estomacal (HOA et al., 2000) e durante a elaboração, transporte e armazenamento de rações (GIL TURNES et al., 1999). Além disso, estudos têm demonstrado que são capazes de auxiliar o ganho de peso, controlar diarréias e reduzir a mortalidade perinatal em suínos (ZANI et al., 1998) e em frangos (VILÀ et al., 2009).

Sacharomyces boulardii é uma levedura não patogênica utilizada no tratamento e prevenção de diversas doenças do trato gastrointestinal (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001). Estudos têm demonstrado que este probiótico, o qual mantém suas propriedades mesmo quando associado a antimicrobianos (ROLFE et al., 2000), é capaz de proteger camundongos contra as toxinas de *Clostridium difficile* (CORTHIER et al., 1992) e contra infecções por *Salmonella Typhimurium* e *Shigella flexneri* (RODRIGUES et al., 1996), aumentar significativamente as concentrações de IgA específicas (QAMAR et al., 2001) e estimular a resposta imune humoral de camundongos a antígenos específicos (COPPOLA et al., 2004).

A levedura *Sacharomyces boulardii* e esporos da bactéria *Bacillus cereus* var. *toyoi* são utilizados como probióticos em rações animais, pois possuem alta resistência às condições ambientais, o que facilita sua elaboração, conservação e administração. Segundo Roos (2009), esses probióticos, os quais são eficientes moduladores da resposta vacinal e uma alternativa para melhorar a eficiência de

vacinas comerciais, estimulam um perfil distinto de citocinas, o que sugere que a modulação do sistema imune mediada por eles possui mecanismos distintos. Entretanto, o efeito sinérgico desses dois probióticos ainda não foi avaliado.

Por isso, nosso grupo de pesquisa se propõe a avaliar o sinergismo entre esses dois probióticos em relação a imunomodulação e para isso, se faz necessário avaliar a resistência ao trato gastrointestinal (GI) dos dois micro-organismos administrados simultaneamente. Assim, o objetivo do presente trabalho é avaliar a resistência ao trato gastrointestinal desses dois probióticos quando administrados simultaneamente a camundongos.

2 METODOLOGIA

2.1 Micro-organismos e condições de crescimento

2.1.1 *B. cereus* var. *Toyo*

Para utilização nos experimentos, os esporos da bactéria foram ressuspensos em solução salina estéril, repicada em placas contendo ágar sangue (8% de sangue ovino) e as placas incubadas por 24 horas à 37°C. Tubos contendo 150 mL de caldo Infusão de cérebro e coração (BHI) foram inoculados com duas a três colônias de *B. cereus* var. *toyo* e incubados sob agitação (200 rpm) a 37 °C por 16 -18 horas. Cinquenta mililitros desse inóculo foram adicionados a 1 L de meio NYSM (Nutrient broth, yeast extract, MnCl₂, MgCl₂, CaCl₂) (YOUSTEN, 1984), e o cultivo foi mantido sob agitação de 200 rpm à 37 °C durante 96 h, centrifugado a 5000 x g por 20 min à 4 °C e ressuspensa a um volume de 30 mL. Por fim, a suspensão final foi aquecida em banho-maria a 80 °C durante 15 min para eliminar formas vegetativas do bacilo.

2.1.2 *S. boulardii*

A levedura liofilizada foi ressuspensa em solução salina estéril, repicada em placas contendo ágar Levedura, Peptona e Dextrose (YPD) a 2% e as placas incubadas por 42 h à 28 °C. Tubos contendo 150 mL de caldo YPD foram inoculados com duas a três colônias de *S. boulardii* e incubados sob agitação (200 rpm) à 28 °C por 24 h. Cinquenta mililitros desse inóculo foram adicionados a 1 L de caldo YPD, o cultivo foi mantido sob agitação de 200 rpm à 28 °C durante 72 h, centrifugado a 4000 x g por 20 min à 4 °C e ressuspensa a um volume de 30 mL.

2.2 Resistência ao trato gastrointestinal de camundongos

Para esse experimento, foram utilizados 9 camundongos Balb/c machos de 5 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da UFPel, alimentados com ração sem antimicrobianos e tratados de acordo com as normas internacionais e em consonância com os princípios éticos de experimentação animal do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Os animais foram divididos em três grupos de acordo com o probiótico administrado: grupo 1 (G1) somente com *S. boulardii*, grupo 2 (G2) somente com esporos de *B. cereus* var. *toyo* e grupo 3 (G3) com *S. boulardii* e esporos de *B. cereus* var. *toyo* simultaneamente. A administração foi realizada através de gavagem, em dose única oral de 300µL.

Fezes foram coletadas nos períodos 0, 24, 48 e 72 horas após a administração dos micro-organismos. E estas foram diluídas em série decimal em solução salina a 0,9% e contagens de UFC. g⁻¹ de *S. boulardii* e *B. cereus* var. *toyo* em fezes frescas foram determinadas através do plaqueamento das diluições seriadas das fezes em placas contendo agar YPD e BHI, respectivamente. As taxas de

sobrevivência foram calculadas como as porcentagens do log do número de UFCs que cresceram nas placas após a exposição ao trato gastrointestinal em relação a contagem inicial.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As taxas de sobrevivência ao trato GI dos probióticos *B. cereus* var. *toyoi* e *S. boulardii* administrados isoladamente e co-administrados são apresentadas na Tabela 1. Os probióticos *B. cereus* var. *toyoi* e *S. boulardii* apresentaram elevada sobrevivência a passagem através do trato gastrointestinal de camundongos quando co-administrados, após 24 h de administração, apresentando taxas de sobrevivência de 79,5 e 59,2%, respectivamente. Observou-se também que as taxas de sobrevivência foram similares quando os probióticos foram administrados isoladamente e simultaneamente, o que indica que praticamente não ocorreu inibição entre eles.

Tabela 1. Taxas de sobrevivência ao trato GI dos probióticos *B. cereus* var. *toyoi* e *S. boulardii* administrados isoladamente e co-administrados.

	Taxas de sobrevivência ao trato GI dos probióticos			
	Esporos de <i>B. cereus</i> var. <i>toyoi</i>	Esporos de <i>B. cereus</i> var. <i>toyoi</i> co-administrados a <i>S. boulardii</i>	<i>S. boulardii</i>	<i>S. boulardii</i> co-administrado a esporos de <i>B. cereus</i> var. <i>toyoi</i>
0 h	-	-	-	-
24 h	85,3	79,5	69,5	59,2
48 h	48,2	55,4	60	49,4
72 h	-	-	44,8	31,5

Além disso, como esperado, esporos de *B. cereus* var. *toyoi* apresentaram maior resistência ao trato GI do que *S. boulardii*.

4. CONCLUSÕES

Com esse trabalho, concluiu-se que os probióticos *Sacharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *toyoi* resistem bem ao trato gastrointestinal quando co-administrados e podem, assim, serem utilizados simultaneamente em estudos futuros para avaliar o efeito sinérgico sobre o potencial probiótico desses dois micro-organismos.

5 REFERÊNCIAS

COPPOLA, M.M., CONCEIÇÃO, F.R., GIL TURNES, C. Effect of *Sacharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the humoral and cellular response of mice to vaccines. **Food and Agricultural Immunology**, Basingstoke, v.16, (no prelo) 2004.

CORTHIE, G et al. Effect of oral *Sacharomyces boulardii* treatment o the activity of *Clostridium difficile* e toxins in mouse digestive tract. **Toxicon**, Oxford, v.30, n.12, p. 1583-1589, 1992.

GIL-TURNES, C et al. Properties of the *Bacillus cereus* strain used in probiotic CenBiot, **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.30, n.1, p 11-14, 1999.

HOA, N.T. et al. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.12, p.5247-2000

HOLZAPPEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. Food Research International, Amsterdam, v.35, n2-3, p.109-116, 2002.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. **Food Research International**, Amsterdam, v.34, n.9, p.791-796, 2001.

QAMAR et al. *Sacharomices boulardii* stimulates intestinal immunoglobulin A immune response to *Clostridium difficile* toxin A in mice. **Infection and Immunity**, Washington, v.69, n.4, p. 2762-2767, 2001.

RODRIGUES, A. C. Effect of *Sacharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella typhimurium* and *Shigela flexneri* in conventional and gnotobiotic mice. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.81, n.3, p.251-256, 1996.

ROOS, T.B. **Efeito imunomodulador de *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Saccharomyces boulardii* em animais vacinados contra Herpesvírus Bovino tipo 5.** Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, 2009.

VILÀ, A.F. BADIOLA, I.; ESTEVE-GARCIA, E. , JIMÉNEZ, G. ; CASTILLO, M.; J BRUFAU, J. Reduction of *Salmonella enterica* var. Enteritidis colonization and invasion by *Bacillus cereus* var. *toyoi* inclusion in poultry feeds. **Poultry Science** v:88 ; 975–979; 2009

ZANI, J.L. et al. Effect of probiotic CenBiot on the control of diarrhoea and feed efficiency in pigs. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.84, n.1, p.68-71, 1998.

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potencial as a mosquitolarvicide. **Advances in Biotechnology Processes**, vol. 3, p. 315-343, 1984.

WILLIAMS, L. D.; BURDOCK G.A.; JIMÉNEZ, G.; CASTILLO, M. Literature review on the safety of Toyocerin, a non-toxigenic and non-pathogenic *Bacillus cereus* var. *toyoi* preparation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v:55, 236–246; 2009.