



VIABILIDADE CELULAR E PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS RAW 264.7 ESTIMULADOS COM *Lactobacillus casei* CSL3 POTENCIALMENTE PROBIÓTICO

H. R. S. Vitola¹, C. E. S. Cruzen¹, R. N. Fonseca², S. O. Hubner², W. P. Silvia³; Â. M. Fioretini³

1-Departamento de Ciências e Tecnologia Agroindustrial – Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – CEP: 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil, Telefone: (53) 3275-7378 – Fax: (53) 32759031 – e-mail: (helena_rsv@hotmail.com)

2- Departamento de Veterinária Preventiva – Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Veterinária – CEP: 96001-970 – Pelotas – RS – Brasil, Telefone: (53) 3275-7203

3- Departamento de Ciências e Tecnologia Agroindustrial – Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – CEP: 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil, Telefone: (53) 3275-7378 – Fax: (53) 32759031

RESUMO – Objetivou-se no presente estudo avaliar a viabilidade celular e a síntese de óxido nítrico (NO) por macrófagos RAW 264.7 quando estimulados com diferentes concentrações de *L. casei* CSL3. Para avaliar a viabilidade celular utilizou-se ensaio de MTT e para síntese de óxido nítrico o reagente de Griess. A partir dos resultados pode-se observar que concentrações iguais ou inferiores a 8 log UFC.mL⁻¹ de *L. casei* CSL3 não afetaram a viabilidade celular dos macrófagos. Com relação a síntese de óxido nítrico foi possível notar que com o aumento da concentração da bactéria houve um aumento na produção do NO. Conclui-se que *L. casei* CSL3, potencialmente probiótico, pode ser administrado em concentrações referentes a ≤ 8 log UFC. mL⁻¹ e que o mesmo pode influenciar no sistema imunológico, através do estímulo para a produção de NO.

ABSTRACT – The objective of this study was to evaluate cell viability and nitric oxide synthesis by RAW 264.7 macrophages when stimulated with different concentrations of *L. casei* CSL3. MTT assay was used to evaluate cell viability and for Griess reagent nitric oxide synthesis. Through the results it can be seen that concentrations equal to or less than 8 log UFC.mL⁻¹ of *L. casei* CSL3 did not affect the cell viability of macrophages. Regarding the nitric oxide synthesis, it was possible to notice that with the increase in the concentration of the bacteria, there was an increase in NO production. Finally, it is concluded that *L. casei* CSL3 potentially probiotic can be administered in concentrations of ≤ 8 log UFC. mL⁻¹ and that it can influence the immune system by stimulating NO production.

PALAVRAS-CHAVE: probióticos, macrófagos, citotoxicidade, óxido nítrico, sistema imunológico

KEYWORDS: bacteria, probiotics, macrophages, cytotoxicity, nitric oxide



1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda de mercado por alimentos que tragam benefícios à saúde, vêm chamando atenção dos consumidores e, neste cenário, que busca-se por novas tendências na área de alimentos, é que se consolidam os alimentos funcionais. Tal alegação está diretamente relacionada ao papel metabólico ou fisiológico que um nutriente ou um não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento e manutenção do organismo humano (BRASIL, 1999). Estima-se que, a maior parcela do mercado total de alimentos funcionais, é representada por produtos probióticos (GVR, 2019).

Caracterizados como microrganismos vivos que, quando administrados regularmente e em quantidades suficientes, conferem benefício à saúde do hospedeiro (WHO/FAO, 2001), os probióticos podem atuar no sistema gastrointestinal por meio de variados mecanismos funcionais (WHO/FAO, 2006). As estirpes probióticas podem ter ação antibacteriana modulando o ambiente luminal, induzindo a secreção de muco e IgA, produzindo substâncias bacteriostáticas e/ou bactericidas como ácidos orgânicos, dióxido de carbono e bacteriocinas (Eid, et al., 2016; Georgieva et al., 2015). Essas podem também competir com microrganismos patogênicos impedindo sua entrada pelo epitélio devido sua capacidade de aderir as células intestinais, parcialmente, bloqueando os locais de adesão ou ainda competindo com outros microrganismos pela limitação de recursos, como por exemplo, o ferro que atua como cofator enzimático (Adrian et al., 2007).

A espécie *Lactobacillus casei*, normalmente, é a mais utilizada em produtos probióticos. Pesquisas demonstram que tais linhagens bacterianas podem alterar a microbiota intestinal e influenciar a resposta imune do hospedeiro (Aktas et al., 2015). Essa espécie está presente em diversificados alimentos como queijos, vinhos, conservas, e ambientes como trato reprodutivo e gastrointestinal de humanos e animais. Previamente analisado, o genoma comparativo desta bactéria demonstrou que pode variar entre 32 - 45 % nas diferentes estirpes de *L. casei* (Broadbent et al., 2012). Por estar compreendido nesta grande variabilidade genética, torna-se de grande valia estudar estirpes provenientes de diferentes habitats e, seu modo de ação frente ao sistema imunológico do hospedeiro.

Receptores presentes nas células do hospedeiro podem reconhecer estruturas moleculares bacterianas conservadas (MAMPs), o resultado desse efeito sinaliza para induzir a produção de citocinas, que incluem interleucinas (IL) e interferons (IFN), quimiocinas, fatores de necrose tumoral (TNF), fator de crescimento transformador (TGF), entre outros (Wells et al., 2010). A ativação de algumas citocinas são desencadeadas mediante ativação de outras, sendo que essas ainda podem ter ação sobre células fagocíticas (Jensen et al., 2015). Em macrófagos ocorre a síntese da enzima óxido nítrico-sintase induzida (iNOS), que é controlada como uma resposta a essas citocinas e influenciarão diretamente na produção de óxido nítrico (Wang et al., 2016).

O óxido nítrico (NO) caracteriza-se por ser um radical livre gasoso, inorgânico, incolor, e possui papel como importante mediador de processos intracelular e extracelular. Quando em processos inflamatórios, células ativadas como por exemplo macrófagos secretam NO e intermediários reativos do oxigênio. A ação citotóxica indireta do NO consiste, principalmente, na sua reação com esses intermediários do oxigênio (Moncada et al., 1991).

O presente estudo teve por objetivo avaliar a viabilidade celular e a síntese de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7, quando estimulados com diferentes concentrações de *L. casei* CSL3.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo celular e bacteriano

Macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) foram cultivados em Meio Essencial Mínimo de Eagle (MEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 2% de penicilina-estreptomicina. A incubação ocorreu a 37 °C, sob uma atmosfera modificada, contendo 5% de CO₂. As células foram utilizadas, após atingir uma confluência relativa a 80%, em placas de 24 cavidades (Pradhan et al., 2016).

A bactéria probiótica *L. casei* CSL3 utilizada na metodologia, previamente isolada e caracterizada por Vitola et al. (2018), foi cultivada em caldo De Man Rogosa e Sharpe (MRS) a 37 °C por 16 h em anaerobiose. Após, centrifugou-se o caldo a 13.000 g, 10 °C por 10 min, descartando o sobrenadante e ressuspensando o pellet em MEM, (sem antibiótico). Foram então realizadas diluições decimais, em MEM, até a recíproca 10⁻¹⁰ UFC.mL⁻¹ para verificar a concentração da bactéria (Oh et al., 2018).

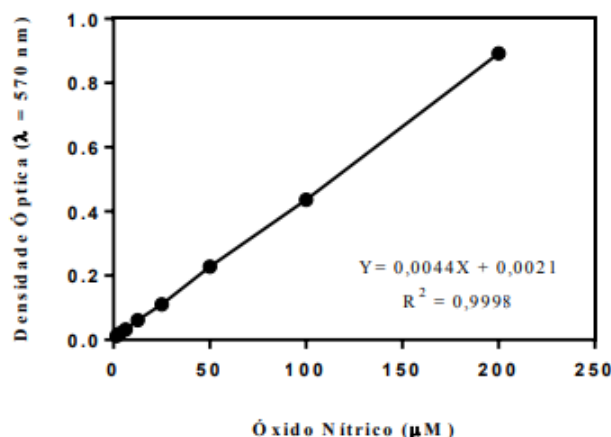
2.2 Ensaio de viabilidade celular

A citotoxicidade de *L. casei* CSL3 sob células RAW 264.7 foi avaliada pelo método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) utilizando placas de poliestireno de 96 cavidades. A cepa RAW 264.7 com uma densidade de 10^6 células/poço foi tratada com diferentes concentrações das bactérias potencialmente probióticas ($2 \log \text{CFU.mL}^{-1}$ a $9 \log \text{CFU.mL}^{-1}$) por 24 h. Em seguida, os sobrenadantes foram retirados e a solução de MTT foi adicionada seguida de incubação no escuro, a 37°C por 4 h. Os cristais de formazan presentes nas células foram dissolvidos em $50 \mu\text{L}$ /poço de álcool etílico por 10 minutos, seguidos pela leitura da absorbância à 540 nm, em espectrofotômetro (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices).

2.2 Síntese de óxido nítrico

O sobrenadante separado na etapa anterior (item 2.1) foi utilizado para avaliar a produção de nitrito, através da mistura de $100 \mu\text{L}$ do mesmo, com $100 \mu\text{L}$ do reagente de Griess. O resultado foi medido pela absorbância em espectrofotômetro à 570 nm, comparando com a curva padrão apresentada na Figura 1 (Wang et al., 2013) e os mesmos foram expressos em μM de óxido nítrico (NO).

Figura 1- Curva padrão para determinação da concentração de óxido nítrico (NO) em sobrenadantes de cultura de células RAW 264.7.



(Fonte: Pinto, 2018)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio de viabilidade celular

Desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, clivam o anel de tetrazólio, transformando-se de um composto de coloração amarela para um composto de coloração azul escuro, chamado formazan (cristais insolúveis em soluções aquosas). Assim sendo, a produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória (Chiang et al., 2012).

Ao se testar uma nova linhagem com potencial probiótico para aplicação, é imprescindível saber se a mesma possui algum tipo de toxicidade para as células do hospedeiro.

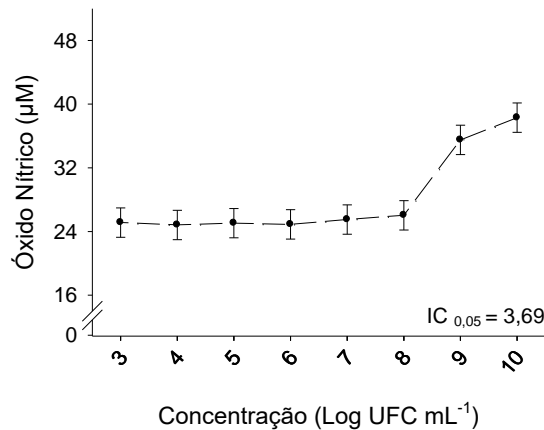
Após 24 h em contato com diferentes concentrações de *L. casei* CSL3 ($2 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ a $10 \log \text{UFC.mL}^{-1}$), observou-se que a concentração de até $8 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ os macrófagos mantinham uma viabilidade

celular referente a 98 %. Oh et al., (2018) avaliaram o potencial probiótico e anti-inflamatório de *Lactobacillus rhamnosus* 4B15 e *Lactobacillus gasseri* 4M13, onde observaram que até a concentração de 8 log UFC. mL⁻¹ a viabilidade celular dos macrófagos RAW 264.7, assim como no presente estudo. Portanto, estima-se que chegando ao seu sítio de ação nessa concentração, *L. casei* CSL3 não influenciará na viabilidade celular.

3.2 Síntese de óxido nítrico

A Figura 2, mostra que o aumento da concentração de *L. casei* CSL3, influencia diretamente na síntese de NO pelos macrófagos, com diferença de produção variando de 25 µM a 36 µM.

Figura 2- Síntese de óxido nítrico relacionado a concentração de *L. casei* CSL3 aplicado em macrófagos RAW 264.7. As barras verticais indicam o intervalo de confiança em que foram consideradas diferenças significativas quando não houve sobreposição entre as barras verticais.



A produção de NO por macrófagos é um fator essencial para os mecanismos de defesa do hospedeiro. Após a fagocitose, os macrófagos degradam patógenos no fagossomo, através das espécies reativas ao oxigênio (ROS), pela ativação da NADPH oxidase. Essa ativação, transfere elétrons do NADPH citosólico para o superóxido liberador de oxigênio molecular no lúmen fagossômico. Dentro do fagossomo, o radical livre de oxigênio é convertido rapidamente em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela superóxido dismutase, que por sua vez reage com o ferro para gerar radicais hidroxila altamente reativos (HO). Coletivamente, essas ROS altamente reativas e tóxicas bem como outras espécies reativas de nitrogênio, demonstram ser altamente eficazes como agentes antimicrobianos (Flannagan et al., 2009).

Kang et al. (2019), avaliaram a produção de óxido nítrico em macrófagos tratados com bactérias ácido lácticas isoladas de alimentos fermentados. Os autores notaram uma menor influência na produção de NO, tendo sua síntese variando entre 5 µM a 20 µM, enquanto Chang et al. (2015) ao avaliarem o efeito de bactérias lácticas isoladas de mostarda fermentada na atividade imunopotenciadora, observaram que das 159 estirpes, três estirpes exerceram um acentuado aumento na produção de NO, estando tais concentrações no intervalo de 6,39 a 11,58 µM, inferiores ao apresentado no presente estudo, mostrando que esta influência é dependente de cada isolado ou cepa.

Khalkhali e Mojgani (2017) demonstraram em sua pesquisa que *Enterococcus faecium* influi sob a imunidade da mucosa ao aumentar o número de linfócitos T intraepiteliais, bem como, estimula a produção de IgA, macrófagos e células dendríticas a produzir óxido nítrico e digerir microrganismos.

Por se tratar de um isolado não-tóxico para as células, presume-se que em um processo inflamatório ocasionado por patógenos, *L. casei* CSL3 poderá influenciar na produção de óxido nítrico, pelos macrófagos, que agiriam inibindo tais microrganismos patogênicos.



4. CONCLUSÕES

A bactéria *L. casei* CSL3 em concentrações de $\leq 8 \log$ UFC. mL⁻¹ não é considerada tóxica para as células e ainda, a mesma possui influência sob a síntese de óxido nítrico, atuando, portanto, no sistema imune do hospedeiro. No entanto, mais pesquisas acerca de sua atividade imunomodulatória *in vivo* serão necessárias.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pelo financiamento do estudo. Código Financeiro 001.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adrian, K., Barron, M. R., Bentrem, D. J., Xu, Y., Phukan, S., Sadim, M., Pasche, B., Discristofano, A. & Grippo, P. J. (2007). TGFβR1 Haploinsufficiency inhibits the development of murine mutant Kras-Induced pancreatic precancer. *Pancreas*, 35 (4), 391- 439.
- Aktas, B., Wolfe, T. J., Tandee, K., Safdar, N., Darien, B. J. & Steele, J. L. (2015). The effect of *Lactobacillus casei* 32g on the mouse cecum microbiota and innate immune response is dose and time dependent. *PLoS ONE*, 10 (12), 1–19.
- Brasil. (1999). *Diretrizes Básicas Para Análise E Comprovação De Propriedades Funcionais E Ou De Saúde Alegadas Em Rotulagem De Alimentos*. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 03 de maio de 1999.
- Broadbent, J. R., Neeno-Eckwall, E. C., Stahl, B., Tandee, K., Cai, H., Morovic, W., Horvath, P., Heidenreich, J., Perna, N. T., Barrangou, R. & Steele, J. L. (2012). Analysis of the *Lactobacillus casei* supragenome and its influence in species evolution and lifestyle adaptation. *BMC Genomics*, 13, 1-18.
- Chiang, S., Liu, Tseng, K., Mau, J. & Pan T. (2012). Immunomodulatory effects of dead *Lactobacillus* on murine splenocytes and macrophages. *Food and Agricultural Immunology*, 23 (2), 183-202.
- Chang, C. K., Wang, S. C., Chiu, C. K., Chen, S. Y., Chen, Z. T. & Duh, P. D. (2015). Effect of lactic acid bacteria isolated from fermented mustard on immunopotentiating activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5 (4), 281-286.
- Eid, R., El Jakee, J., Rashidy, A., Asfouz, H., Omara, S., Kandil, M.M., Mahmood, Z., Hahne, J. & Seida, A.A. (2016). Potential Antimicrobial Activities of Probiotic *Lactobacillus* Strains Isolated from Raw Milk. *Journal of Probiotics & Health*, 4 (2), 1000138.
- Flannagan, R. S., Cosío, G. & Grinstein, S. (2009). Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 355-366.
- Georgieva, R., Yocheva, L., Tserovska, L., Zhelezova, G., Stefanova, N., Atanasova, A., Danguleva, A., Ivanova, G., Karapetkov, N., Rumyan, N. & Karaivanova, E. (2015). Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29 (1), 84-91.
- Grand View Research (GVR). (2019). *Probiotics Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Food & Beverages, Dietary Supplements), By Ingredient (Bacteria, Yeast), By End Use, By Distribution Channel, And Segment Forecasts, 2019 - 2025*. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/probiotics-market>.
- Jensen, H., Marie, S., Lars, A. & Stine, G. (2015). Immunomodulation of Monocytes by Probiotic and Selected Lactic Acid Bacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 7 (14), 14-23.
- Kang, C., Han, S. H., Kim, J. S., Kim, Y. G., Jeong, Y., Park, H. M. & Paek, N. S. (2019). Inhibition of Nitric Oxide Production, Oxidative Stress Prevention, and Probiotic Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from the Human Vagina and Fermented Food. *Microorganisms*, 7 (4), 1–10.
- Khalkhali, S. & Mojgani, N. (2017). *Enterococcus faecium*: a suitable probiotic candidate for modulation of immune responses against pathogens. *International Journal of Basic Science in Medicine*, 2 (2), 77 – 82.



- Moncada, S., Palmer, R. M. & Higgs, E. A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 43, 109-142.
- Oh, N. S., Joung, J. Y., Lee, Y. J. & Younhoon, K. (2018). Probiotic and anti-inflammatory potential of *Lactobacillus rhamnosus* 4B15 and *Lactobacillus gasseri* 4M13 isolated from infant feces. *PLoS ONE*, 13 (2), 1–15.
- Pinto, L. N. (2018) *Citotoxicidade e produção de óxido nítrico em células RAW 264.7 tratadas com o extrato aquoso da Campomanesia xanthocarpa*. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- Pradhan, B., Guha, D., Ray, P., Das, D. & Aich, P. (2016). Comparative Analysis of the Effects of Two Probiotic Bacterial Strains on Metabolism and Innate Immunity in the RAW 264.7 Murine Macrophage Cell Line. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 8 (2), 73–84.
- Vitola, H. R. S., Dannenberg, G. S., Marques, J. L., Lopes, G. V., Da Silva, W. P. & Fiorentini, A. M. (2018). Probiotic potential of *Lactobacillus casei* CSL3 isolated from bovine colostrum silage and its viability capacity immobilized in soybean. *Process Biochemistry*, 75, 22-30.
- Wang, Y., Xie, J., Li, Y., Dong, S., Liu, H., Chen, J., Wang, Y., Zhao, S., Zhang, Y. & Zhang, H. (2016). Probiotic *Lactobacillus casei* Zhang reduces pro-inflammatory cytokine production and hepatic inflammation in a rat model of acute liver failure. *European Journal of Nutrition*, 55, 821-831.
- Wang, Y., Xie, J., Wang, N., Li, Y., Sun, X., Zhang, Y. & Zhang, H. (2013). *Lactobacillus casei* Zhang modulate cytokine and Toll-like receptor expression and beneficially regulate poly I:C-induced immune responses in RAW264.7 macrophages. *Microbiology and Immunology*, 57 (1), 54–62.
- Wells, J. M., Loonen, L. M. P. & Karczewski, J. M. (2010). The role of innate signaling in the homeostasis of tolerance and immunity in the intestine. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 41-48.
- World Health Organization/ Food and Agriculture Organization of the United Nations (WHO/FAO). (2001) *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. Cordoba.
- World Health Organization/ Food and Agriculture Organization of the United Nations (WHO/FAO). (2006). *Probiotic in food, Health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. Roma.