

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Veterinária**



Dissertação

**Avaliação de *Bacillus toyonensis* como bioadjuvante em vacina recombinante**

**Francisco Denis Souza Santos**

Pelotas, 2016

**Francisco Denis Souza Santos**

**Avaliação de *Bacillus toyonensis* como bioadjuvante em vacina recombinante**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Dr. Fábio Pereira Leivas Leite  
Coorientador: Dr. Rodrigo Casquero Cunha

Pelotas, 2016

Dados de catalogação na fonte:  
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S237a Santos, Francisco Denis Souza

Avaliação de *Bacillus toyonensis* como bioadjuvante em vacina recombinante / Francisco Denis Souza Santos. – 58f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária, 2016. – Orientador Fábio Pereira Leivas Leite ; co-orientador Rodrigo Casquero Cunha.

1.Veterinária. 2.*Bacillus toyonensis*. 3.Probiótico.  
4.Esporo. 5.Imunomodulação. 6.Vacinas. 7.Camundongos.  
I.Leite, Fábio Pereira Leivas. II.Cunha, Rodrigo Casquero.  
III.Título.

CDD: 615.1

Francisco Denis Souza Santos

Avaliação de *Bacillus toyonensis* como bioadjuvante em vacina recombinante

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 24/02/2016

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (Orientador)  
Ph.D. em Veterinary Sciences pela University of Wisconsin

Prof. Dr. Geferson Fischer  
Doutor em Biotecnologia Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Luciana Farias Costa de Avila  
Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Silvia de Oliveira Hübner  
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Rodrigo Casquero Cunha (Suplente)  
Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Dedico este trabalho a minha Família pelo amor incondicional

## **Agradecimentos**

A Deus por guiar os meus passos e por mais esta vitória que Ele tem preparado em minha vida.

À minha família pelo amor incondicional e pelo incentivo.

Aos amigos pelo apoio em todos os momentos.

Ao professor Dr. Fábio Leivas Leite pela orientação neste trabalho e pela amizade construída durante o período do curso.

Ao meu Coorientador Dr. Rodrigo Cunha pela sua orientação, ajuda e grande amizade.

A Dra. Luana Dummer pela sua disposição em ajudar através dos vários e-mails trocados.

A nossa aluna de iniciação científica Yasmine pela disposição em ajudar e pela parceria durante a realização do experimento.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia e do nosso grupo de pesquisa: Lívia, Renan, Alceu, Vitória, Paula, Iuri, Paulo, Jorge e Pedro.

Aos amigos do Laboratório XI: Ana Paula, Ana Vianna, Jéssica, Guilherme e a nossa querida professora Luciana Avila.

A equipe do Biotério Central da UFPel representada pela funcionária Fabiane Chaves pela ajuda durante a realização do experimento com os animais.

Ao Laboratório de Virologia e Imunologia da UFPel pelo auxílio nas análises.

Ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária.

A CAPES pela Bolsa de estudo.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

***“O temor do Senhor é o princípio da sabedoria. Provérbios cap.1 verso 7”***

## Resumo

SANTOS, Francisco Denis Souza. **Avaliação de *Bacillus toyonensis* como bioadjuvante em vacina recombinante.** 2016. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

*Bacillus toyonensis* é uma bactéria probiótica que exerce efeito imunomodulador, capaz de aprimorar a eficácia de vacinas. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito imunomodulador de *B. toyonensis* em camundongos vacinados com a glicoproteína D recombinante de herpesvírus bovino tipo 5. Os camundongos foram divididos aleatoriamente em oito grupos experimentais. O grupo B.t integral recebeu a suplementação com o probiótico durante todo o período experimental. O grupo B.t 7dias foi suplementado nos sete dias que antecederam a primeira dose da vacina. O grupo Esp vivo s.c. recebeu a inoculação de esporos viáveis de *B. toyonensis* pela via subcutânea (s.c.) simultaneamente a vacina. O grupo Esp inat s.c. recebeu a inoculação esporos inativados pela via s.c. simultaneamente a vacina. O grupo Esp vivo+rgD recebeu o antígeno vacinal associado aos esporos vivos. O grupo Esp inat+rgD recebeu o antígeno vacinal associado aos esporos inativados. Os grupos rgD+Al(OH)<sub>3</sub> e rgD+PBS foram os grupos controle, não receberam suplementação com o probiótico nem inoculação de esporos. A resposta imune humoral foi avaliada por ELISA e por soroneutralização. Os animais de todos os grupos responderam a vacina com a produção de anticorpos IgG totais. Os grupos suplementados com o probiótico (B.t integral e B.t 7dias) assim como os que receberam a inoculação de esporos simultaneamente a vacina (Esp vivo s.c. e Esp inat s.c.) apresentaram níveis de anticorpos superiores, apresentando diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) quando comparados aos grupos controle. Os grupos que receberam o antígeno vacinal associado aos esporos (Esp vivo+rgD e Esp inat+rgD) apresentaram níveis de anticorpos inferiores quando comparados aos grupos suplementados. Os resultados indicam que o probiótico *B. toyonensis* apresenta efeito imunomodulador em camundongos vacinados com a glicoproteína D recombinante de herpesvírus bovino tipo 5 constituindo-se numa alternativa para aumentar a eficiência de vacinas

**Palavras-chave:** probiótico; esporo; imunomodulação; vacinas; camundongos



## Abstract

SANTOS, Francisco Denis Souza. **Assessment of *Bacillus toyonensis* as recombinant vaccine bioadjuvant.** 2016. 58f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

*Bacillus toyonensis* is a probiotic bacterium that exerts immunomodulatory effect, capable to enhance the effectiveness of vaccines. The objective of this study was to investigate the immunomodulatory effect of *B. toyonensis* in mice vaccinated with the recombinant glycoprotein D of bovine herpesvirus type 5. Mice were randomly divided into eight experimental groups. The complete B.t group received supplementation with the probiotic during all the experimental period. The 7days B.t group was supplemented seven days prior to the first vaccine dose. The sc live Esp group received an inoculation of viable spores of *B. toyonensis* subcutaneously (sc) simultaneously to the vaccine. The sc inact Esp group received an inoculation of inactivated spores via sc simultaneously to the vaccine. The live Esp+rgD group received the vaccine antigen associated with living spores. The inact Esp+rgD group received the vaccine antigen associated with inactivated spores. The rgD+Al(OH)<sub>3</sub> and rgD+PBS, were control groups, did not received supplementation with the probiotic, nor spore inoculation. The humoral immune response was evaluated by ELISA and serum neutralization. The animals of all groups responded to the vaccine with the total IgG antibody production. The groups supplemented with probiotic (complete B.t and 7days B.t) as well as the ones that received the spore inoculation simultaneously to the vaccine (sc live Esp and sc inact Esp) showed higher levels of antibodies, showing statistical difference ( $p \leq 0,05$ ) when compared to the unsupplemented ones. The groups that received the vaccine antigen associated to the spores (live Esp+rgD and inact Esp+rgD) showed lower antibodies levels when compared to the supplemented groups. The results indicate that the probiotic *B. toyonensis* has an immunomodulatory effect in mice vaccinated with the recombinant glycoprotein D of bovine herpesvirus type 5, establishing an alternative to increase the vaccines efficacy.

**Keywords:** probiotic; spore; immunomodulation; vaccines; mice

## Lista de Figuras

Figura 1	Delineamento experimental.....	30
Figura 2	Dinâmica dos níveis totais de IgG em camundongos vacinados com a rgD de BoHV-5 e suplementados com <i>B. toyonensis</i> .....	34
Figura 3	Titulação dos níveis totais de IgG em camundongos vacinados com a rgD de BoHV-5 e suplementados com <i>B. toyonensis</i> .....	36
Figura 4	Perfil de isotipos de imunoglobulinas em camundongos vacinados com a rgD de BoHV-5 e suplementados com <i>B. toyonensis</i> .....	37

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Distribuição dos grupos experimentais utilizados no trabalho.....	30
Tabela 2	Títulos de anticorpos neutralizantes em camundongos vacinados com a rgD de BoHV-5 e suplementados com <i>B. toyonensis</i> .....	38

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ADCC	Citotoxicidade celular mediada por anticorpo
Al(OH) <sub>3</sub>	Hidróxido de alumínio
APCs	Células apresentadoras de antígeno
BHI	Infusão cérebro coração
BoHV-1	Herpesvírus bovino tipo 1
BoHV-5	Herpesvírus bovino tipo 5
CCID100%	Dose infectante para 100% do cultivo celular
CD	Molécula de diferenciação
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DCs	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
GALT	Tecido linfoide associado ao intestino
gD	Glicoproteína D
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IECs	Células epiteliais intestinais
IFN-γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A

IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
L	Litros
MBDK	<i>Madin-Darby bovine kidney</i>
MEN	<i>Minimal essential medium</i> (Meio essencial mínimo)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitro
ng	Nanograma
NK	<i>Natural Killer</i>
NLRP3	<i>NOD-like receptor domain 3</i>
OPD	Ortho-Phenylenediamine
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução salina fosfatada
PBS-T	Solução salina fosfatada contendo 0,05 % de Tween-20
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
rgD	Glicoproteína D recombinante
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
rgD	Glicoproteína D recombinante
rpm	Rotação por minuto
SN	Soroneutralização
TLRs	Receptores <i>toll-like</i>
Th	T auxiliar

TGF- $\beta$	Fator transformador de crescimento beta
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Unidade formadora de colônia
WHO	Organização Mundial da Saúde
v/v	Volume/volume

## Sumário

<b>1 Introdução.....</b>	<b>14</b>
<b>2 Revisão da Literatura.....</b>	<b>16</b>
<b>3 Objetivos.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>27</b>
<b>4 Material e Métodos.....</b>	<b>28</b>
<b>5 Resultados.....</b>	<b>33</b>
<b>6 Discussão.....</b>	<b>39</b>
<b>7 Considerações Finais.....</b>	<b>44</b>
<b>Referências.....</b>	<b>45</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>57</b>

## 1 Introdução

Segundo a Organização Mundial da Saúde e a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (2002) probióticos são definidos como microrganismos vivos, que quando ingeridos em quantidades adequadas, conferem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro. Os probióticos podem prover proteção contra patógenos na mucosa intestinal do hospedeiro, assim como, assumem um importante papel no desenvolvimento da resposta imune sistêmica através da imunomodulação (FORSYTHE & BIENENSTOCK, 2010).

Os mecanismos pelos quais os probióticos atuam incluem a alteração da microbiota intestinal, fortalecimento e modificação da barreira intestinal, produção de moléculas antimicrobianas, inibição da adesão de patógenos e modulação da resposta imune (THOMAS & VERSALOVIC, 2010). A imunomodulação mediada pelos probióticos foi demonstrada pela proliferação de células do sistema imune, aumento na produção de anticorpos, aumento na atividade de fagócitos e indução na produção de citocinas (BORCHERS et al., 2009).

Os probióticos são utilizados na prevenção e no tratamento de doenças, no controle de distúrbios do metabolismo do trato gastrointestinal, na inibição da carcinogênese, como promotores de crescimento na alimentação animal, se constituindo uma alternativa ao uso dos antibióticos (COPOLLA & GIL-TURNES, 2004). Os probióticos comumente utilizados na alimentação humana são os *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp. que apresentam limitação para serem utilizados na alimentação animal, pois são sensíveis as condições adversas do meio ambiente. Ao contrário, as bactérias do gênero *Bacillus* sp. tem a capacidade de esporular e resistir aos processos de elaboração, conservação, armazenamento e administração de rações para animais (CUTTING, 2011; GIL-TURNES et al., 1999).

*Bacillus toyonensis* é uma bactéria Gram positiva formadora de esporos, não patogênica que não produz enterotoxinas e não é geneticamente modificada. Foi primeiramente identificada como *B. cereus* var. *toyoi*, recentemente, foi proposta como uma nova espécie do grupo *B. cereus* com o nome de *B. toyonensis* (JIMÉNEZ et al., 2013). É utilizada há várias décadas como probiótico na



alimentação animal, melhorando a eficiência alimentar e provendo benefícios a saúde dos animais (GIL-TURNES; CONCEIÇÃO; GIL DE LOS SANTOS, 2007). *Bacillus toyonensis* exerce efeito imunomodulador sendo capaz de aprimorar a eficácia de vacinas em ovinos, suínos e murinos através da modulação da resposta imune (ROOS et al., 2010; SCHIERACK et al., 2007; COPOLLA et al., 2005).

O uso de vacinas é uma alternativa eficiente na profilaxia e controle de doenças infecciosas. As vacinas baseadas em antígenos recombinantes são mais seguras, pois não causam reações adversas, como o risco de reversão a virulência, no entanto, muitas vezes são pouco imunogênicas e por isso são administradas com adjuvantes para aumentar sua imunogenicidade (MBOW et al., 2010; REED et al., 2009). Vacinas recombinantes contra os herpesvírus são baseadas nas principais glicoproteínas do envelope viral (BABIUK et al., 1996). A glicoproteína D de herpesvírus bovino tipo 5 é essencial para a ligação e penetração do vírus nas células permissivas, é um dos principais alvos da resposta imune do hospedeiro induzindo uma forte resposta imune humoral e celular durante a infecção (DUMMER; LEITE; VAN DRUNET DEN HURK, 2014).

Na mucosa intestinal do hospedeiro os microrganismos probióticos interagem diretamente com as células epiteliais intestinais e com as células dendríticas estimulando a função intestinal e a resposta imune inata e adaptativa (GÓMEZ-LLORENTE; MUÑOZ; GIL, 2010). As células dendríticas respondem a interação com os probióticos com a produção de citocinas, expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e moléculas co-estimulatórias que vão polarizar as respostas dos linfócitos T auxiliares (LEBEER; VANDERLEYDEN; KEERSMAECKER, 2010).

Os probióticos modulam a resposta imune e incrementam a eficácia de vacinas. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de *B. toyonensis* na modulação da resposta imune em camundongos vacinados com a glicoproteína D recombinante de herpesvírus bovino tipo 5 suplementados com o probiótico durante dois períodos diferentes. Além disso, avaliar o efeito de esporos de *B. toyonensis* administrados pela via subcutânea simultaneamente a vacina, e também associados ao antígeno vacinal.

## 2 Revisão de Literatura

### 2.1 Probióticos

Probióticos são preparações que contêm microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas produzem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Destacam-se como probióticos as bactérias ácido lácticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, componentes da microbiota intestinal de humanos e animais (GUARNER; MALAGELADA, 2003; HOLZAPFEL et al., 2002). Espécies de leveduras principalmente *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* (MCFARLAND, 2006) e de *Bacillus* sp. isolados da natureza como *Bacillus toyonensis*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. clausii*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* (CUTTING, 2011; HONG; DUC; CUTTING, 2005). Segundo a FAO/WHO (2002) os requisitos mínimos necessários para um microrganismo obter o status de probiótico incluem a avaliação de sua identidade (gênero, espécie e local de onde foi isolado); testes *in vitro* que demonstrem resistência à acidez gástrica, ácidos biliares, enzimas digestivas e atividade antimicrobiana contra microrganismos potencialmente patogênicos; avaliação de segurança e estudos *in vivo* que comprovem os efeitos benéficos na saúde do hospedeiro.

Os mecanismos responsáveis pelos benefícios dos probióticos na saúde do hospedeiro não estão totalmente elucidados e são alvo de vários estudos. Os principais mecanismos de ação propostos incluem a alteração da microbiota intestinal, fortalecimento da barreira epitelial do intestino, inibição da adesão de patógenos, exclusão competitiva de microrganismos patogênicos, produção de substâncias antimicrobianas e a modulação do sistema imunológico (BERMUDEZ-BRITO et al., 2012).

Os probióticos podem ser usados como profiláticos, imunomoduladores e promotores de crescimento, constituindo-se numa alternativa ao uso de antibióticos na alimentação animal (DURAND & DURAND, 2010; COPPOLA & GIL-TURNES, 2004; KREHBIEL et al., 2003). Os probióticos apresentam potenciais

benefícios na prevenção de doenças e na terapêutica de cães e gatos, podendo ser usados como estimulantes do sistema imunológico e no tratamento de doenças gastrointestinais (WYNN, 2009). Além de haver um interesse crescente na utilização destes microrganismos para o tratamento de doenças renais, urolitíase, infecções no trato urinário e alergias. Contudo estudos bem planejados usando um grande número de animais são necessários para se entender melhor os benefícios dos probióticos na saúde de cães e gatos (CHANDLER, 2014).

Em ruminantes a suplementação com probióticos a base de leveduras pode beneficiar o ecossistema microbiano do trato gastrointestinal melhorando a eficiência da fermentação ruminal modulando as vias de fermentação microbiana (UYENO; SHIGEMORI; SHIMOSATO, 2015). A suplementação de cordeiros com probióticos *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* e *Bifidobacterium longum* modula a função imune e influencia na qualidade da carne (SANTILLO et al., 2012). Ovelhas suplementadas com *B. subtilis* e *B. licheniformes* apresentaram efeito benéfico sobre a produção de leite, aumento no teor de gordura e proteína do leite (KRITAS et al., 2006). Cordeiros suplementados com o probiótico *Enterococcus faecium* apresentaram maior peso corporal, maior ganho de peso diário e melhor conversão alimentar (ANTUNOVIC et al., 2005). Em bezerros a suplementação com um probiótico composto de uma associação de vários microrganismos estimulou o aumento do ganho de peso nos animais suplementados e foi eficiente no controle de diarreias (ÁVILA et al., 2000).

As bactérias formadoras de esporos pertencentes ao gênero *Bacillus*, presentes na natureza e comumente isoladas do solo, estão sendo amplamente utilizadas como probióticos na alimentação animal (HONG; DUC; CUTTING, 2005). Entre as várias espécies deste gênero o *B. toyonensis* é especialmente adequado para ser utilizado como probiótico porque é cultivado em meios de cultivo de baixo custo, apresenta altas taxas de esporulação, resiste à temperatura de peletização permanecendo viável as condições de transporte e armazenamento (GIL-TURNES; CONCEIÇÃO; GIL DE LOS SANTOS, 2007).

*Bacillus toyonensis* é uma bactéria Gram positiva formadora de esporos. Foi isolada do solo no ano de 1966 no Japão, primeiramente identificada como *B. cereus* var. *toyoi*, recentemente, foi proposta como uma nova espécie do grupo *B. cereus* com o nome de *B. toyonensis* (JIMÉNEZ et al., 2013). *Bacillus toyonensis* não é patogênico, não produz enterotoxinas e não é geneticamente modificado.

Esporos viáveis deste microrganismo são utilizados na preparação do TOYOCERIN<sup>®</sup>, uma apresentação comercial usada como probiótico na alimentação de suínos, bovinos, aves e coelhos em vários países. Na Europa o uso deste probiótico foi autorizado pela primeira vez no ano de 1994, se tornando o primeiro microrganismo utilizado como suplemento na alimentação animal na União Européia (WILLIAMS et al., 2009).

O probiótico *B. toyonensis* é usado como suplemento alimentar na criação de suínos, contribuindo para o maior ganho de peso, melhor conversão alimentar, diminuição da incidência de fezes líquidas e diarreias após o desmame e menores taxas de mortalidade em leitões (TARAS et al., 2005; BAUM et al., 2002; ZANI et al., 1998). Fêmeas suínas suplementadas com esporos de *B. toyonensis* no final da gestação apresentaram menor perda de peso durante a amamentação, melhores parâmetros sanguíneos, como o aumento do colesterol sérico e lipídeos totais, maior teor de gordura e proteína do leite. Em consequência disto, efeitos positivos foram observados na saúde e no desempenho dos leitões. As fêmeas suplementadas durante a lactação foram menos acometidas pela síndrome da mastite-metrite-agalaxia (STAMATI et al., 2006). Na dieta de leitões após o desmame este probiótico protegeu contra patógenos entéricos. Foi observado ainda a diminuição no isolamento de bactérias patogênicas e o aumento de bactérias ácido lácticas nas fezes dos animais (KANTAS et al., 2015).

Na avicultura os probióticos são usados como melhoradores de desempenho, reduzem a ocorrência de doenças bacterianas, controlam a colonização do trato intestinal por microrganismos patogênicos, diminuindo assim sua eliminação pelas fezes (LUTFUL KABIR, 2009). A suplementação com probióticos do gênero *Bacillus* podem exercer efeito benéfico sobre a microbiota intestinal, a morfologia do intestino e conseqüentemente melhorar o desempenho no crescimento e a taxa de conversão alimentar (LEI et al., 2015). Frangos de corte que receberam na dieta *B. subtilis* apresentaram melhor desempenho, melhores taxas de conversão alimentar e alteração da microbiota cecal, sendo observada a diminuição dos microrganismos patogênicos presentes nas fezes (LI et al., 2016). A suplementação na dieta de aves com *B. toyonensis* reduziu a prevalência de *Salmonella*, aumentou a eficiência alimentar e diminuiu o índice de mortalidade pela síndrome da ascite aguda (VILÁ et al., 2009; GIL DE LOS SANTOS, 2005; CUEVAS et al., 2000).

## 2.2 Resposta imune

A resposta imune pode ser dividida em dois tipos: a resposta imune inata que reconhece os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) de microrganismos invasores e a resposta imune adaptativa que reconhece antígenos específicos (LITMAN; RAST; FUGMAN, 2010). A resposta imune inata tem primordial importância no reconhecimento e eliminação de microrganismos invasores. As principais células envolvidas na resposta imune inata são neutrófilos, células natural killer (NK), eosinófilos, basófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas (DCs). A função das DCs encontra-se na fase intermediária, entre a resposta imune inata e adaptativa. Estas células capturam, processam e apresentam os antígenos aos linfócitos T (KOENDERMAN; BUURMAN; DAHA, 2012). As células da resposta imune inata detectam potenciais patógenos através de seus receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como os receptores toll-like (TLRs) que reconhecem os PAMPs presentes nos microrganismos invasores desencadeando o início da resposta imune inata (KAWAI & AKIRA, 2011).

A resposta imune adaptativa é mediada pelos linfócitos T e B. O desencadeamento da resposta imune adaptativa ocorre quando os linfócitos T específicos para um antígeno são estimulados pelas células apresentadoras de antígenos profissionais, as DCs, que fornecem os sinais estimuladores necessários para o desenvolvimento das funções efetoras. Os linfócitos B específicos para um antígeno recebem sinais co-estimulatórios dos linfócitos T para desencadear o processo de maturação de afinidade e a troca de isotipo de imunoglobulinas. As interações entre DCs, linfócitos T e os linfócitos B e a sinalização estimulada são importantes para indução de respostas imunes adaptativas efetoras (HAAN; ARENS; ZELM, 2014). A ativação dos linfócitos T pelas DCs requer três sinais: o reconhecimento do antígeno pelo seu receptor de superfície, a estimulação da expressão de moléculas co-estimuladoras e a produção de citocinas (CURTSINGER; MESCHER, 2010).

As citocinas são pequenas proteínas produzidas e secretadas pelas células do sistema imune que tem efeitos locais e sistêmicos e são essenciais no desenvolvimento da resposta imune inata e adaptativa (BOULAY; O'SHEA; PAUL, 2003). As citocinas influenciam no desenvolvimento das subpopulações de linfócitos T auxiliares em Th1, Th2, Th17 ou Treg (MURPHY & REINER, 2002). Os linfócitos

Th1 atuam na resposta imune contra microrganismos intracelulares. Os macrófagos ativados e DCs secretam interleucina 12 (IL-12) que estimula a produção de grandes quantidades de interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e promove a diferenciação de linfócitos T virgens em linfócitos Th1. O IFN- $\gamma$  também atua nos linfócitos B estimulando a produção de anticorpos e a mudança de isotipos com propriedades opsonizantes (WAN & FLAVEL, 2009). Os linfócitos Th2 estimulam reações mediadas pela imunoglobulina IgE e eosinófilos que controlam infecções por helmintos. A resposta Th2 é mediada principalmente pela IL-4, que atua nos linfócitos B para a produção de IgE e pela IL-5 que ativa os eosinófilos (SPENCER & WELLER, 2010). Os linfócitos Th17 secretam a IL-17 que recrutam neutrófilos para os locais de infecção. A resposta Th17 induz inflamação neutrofílica que controla infecções por bactérias e fungos extracelulares (OUYANG; KOLLS; ZHENG, 2008). Os linfócitos Treg produzem as citocinas IL-10 e o fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) que bloqueiam a ativação de linfócitos e macrófagos e inibem a produção de IL-12, mantendo a tolerância imunológica (LEVINGS & RONCAROLO, 2000).

As superfícies mucosas do corpo são as principais portas de acesso para invasão de microrganismos patogênicos (BRANDTZAEG, 2009). Os tecidos linfoides associados ao intestino (GALT) possuem os tipos celulares necessários para o desenvolvimento da resposta imune como macrófagos, DCs, linfócitos T e linfócitos B e compreendem as placas de Peyer e os folículos linfoides que são ligados pelos vasos linfáticos aos linfonodos mesentéricos (MOWAT, 2003). Na mucosa intestinal os antígenos podem interagir com as células do sistema imune através das células especializadas multifenestradas (células M) que captam o microrganismo, por endocitose ou fagocitose, e o transportam até as placas de Peyer (IWASAKI, 2007). DCs podem capturar os antígenos do lúmen intestinal ampliando seus processos citoplasmáticos entre as junções do epitélio sem causar dano a sua integridade (NIESS et al., 2005).

### **2.3 Modulação da resposta imune pelos probióticos**

Os microrganismos probióticos exercem efeito modulador na resposta imune. Os probióticos tem a habilidade de interagir com células epiteliais intestinais (IECs), células dendríticas, macrófagos e linfócitos (BERMUDEZ-BRITO et al., 2012). Na mucosa intestinal do hospedeiro os microrganismos probióticos interagem

diretamente com as IECs e com as DCs estimulando a função intestinal e a resposta imune inata e adaptativa. As IECs e as DCs reconhecem os microrganismos através de seus PRRs, principalmente os TLRs (GÓMEZ-LLORENTE; MUÑOZ; GIL, 2010). A resposta desencadeada pelas IECs depende do subtipo de células. As células de Paneth produzem defensinas e as células caliciformes aumentam a produção de muco. As DCs respondem a interação com os probióticos com a produção de citocinas, moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e moléculas co-estimulatórias que polarizam as respostas dos linfócitos T auxiliares em Th1, Th2, Treg e Th17 (LEBEER; VANDERLEYDEN; KEERSMAECKER, 2010).

Os efeitos dos probióticos na modulação da resposta imune dependem do microrganismo utilizado (HERICH & LEVKUT, 2002). *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp. estimulam células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de humanos a produzirem várias citocinas pró-inflamatórias, tais como: fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e IFN- $\gamma$ , IL-10 e TGF- $\beta$  que estimulam o desenvolvimento de perfis de respostas imunes distintas (SOLIMAN et al., 2015). A administração oral de *Lactobacillus* modula a secreção de citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 nas placas de Peyer e aumenta a expressão TLRs melhorando a resposta imune de camundongos contra *Salmonella typhimurium* (CASTILLO et al., 2011). Em camundongos a suplementação com *L. casei* estimulou o aumento na atividade de células NK, modulando os mecanismos da resposta imune inata (OGAWA et al., 2005; MATSUZAKI, 2000).

Hourau et al. (2006) demonstraram que sobrenadante de cultivo de *Bifidobacterium breve* C50 pode induzir a maturação e aumento da sobrevivência de DCs através da sinalização de TLR2 e alta produção de IL-10. Estas propriedades de *B. breve* C50 sugerem o desenvolvimento de um perfil regulatório nas DCs sobre respostas Th1 e sobre a polarização excessiva de respostas Th2 em indivíduos atópicos. *Bifidobacterium infantis* inibiu a produção de IL-17 e aumentou a de IL-27 e IL-10, quando esplenócitos de camundongos eram estimulados com TGF- $\beta$  e IL-6. Estes resultados sugerem a função moduladora deste microrganismo no tratamento de doenças mediadas pelas respostas Th17 (TANABE et al., 2008).

Huang et al. (2008) estudaram a interação entre os esporos e o GALT de camundongos, administrando pela via oral esporos de *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. flexus* na dieta destes animais. Foi observado o aumento da proliferação celular nos centros germinativos das placas de Peyer, sugerindo que os esporos são

capturados pelas células M e interagem com as APCs e os linfócitos nas placas de Peyer, estimulando a resposta humoral e celular. Os esporos estimularam *in vivo* e *in vitro* a expressão de genes de citocinas pro-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6 pelos esplenócitos e nódulos linfáticos mesentéricos. Em cultivos celulares de macrófagos as células vegetativas de *B. subtilis* estimularam a expressão de genes de receptores TLR2 e TLR4.

Os efeitos moduladores dos probióticos na resposta imune vacinal foram estudados através de experimentos com animais suplementados com probióticos e vacinados com antígenos bacterianos e virais. Camundongos suplementados com o probiótico *B. toyonensis* e vacinados com uma bacterina de *Escherichia coli* mostraram maior soroconversão em relação a animais que não receberam a suplementação (CONCEIÇÃO et al., 2002). COPPOLA et al. (2005) estudaram o efeito da suplementação com *B. toyonensis* e *S. boulardii* em camundongos vacinados com uma bacterina de *E. coli* e com uma vacina replicante contra parvovírus canino. Os animais suplementados com os probióticos apresentaram maiores níveis de anticorpos, *S. boulardii* induziu uma maior soroconversão a bacterina, enquanto, *B. toyonensis* induziu maior soroconversão contra o parvovírus canino.

A modulação da resposta imune pelo probiótico *Enterococcus faecium* (SF68) foi demonstrada em camundongos infectados experimentalmente com *Giardia intestinalis*. Camundongos suplementados com o probiótico apresentaram aumento nos níveis de anticorpos IgA nas fezes, IgG anti-*Giardia* no soro e aumento de linfócitos T auxiliares nas placas de Peyer e no baço. Cães jovens suplementados com *E. faecium* e vacinados com uma vacina atenuada contra o vírus da cinomose apresentaram maiores níveis de IgA e IgG específicos contra o vírus. Estes resultados sugerem que o probiótico *E. faecium* estimula a resposta imune sendo sugerido seu uso na alimentação de cães (BENYACOUB, et al., 2003; 2005).

O probiótico *B. toyonensis* promove efeitos benéficos na saúde de leitões aumentando a imunidade intestinal, foi observado uma maior população de linfócitos T e a diminuição da ocorrência de diarreias causadas por *E. coli* patogênica (SCHAREK et al., 2007). Leitões suplementados com *B. toyonensis* e vacinados com dois antígenos inativados (Influenza e Mycoplasma) apresentaram aumento de populações de PBMCs, linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos e maiores níveis de anticorpos contra os dois antígenos (SCHIERACK et al., 2007). Em fêmeas



suínas a suplementação com este probiótico reverteu parcialmente à supressão do sistema imune durante a gestação (SCHIERACK et al., 2009).

Camundongos suplementados com a levedura *S. boulardii*, e vacinados com uma vacina inativada contra BoHV-5 apresentaram um aumento significativo nos níveis de anticorpos em relação a animais não suplementados. Mesmo após a suspensão da suplementação com o probiótico, os títulos de anticorpos continuaram significativamente maior. Esplenócitos dos animais suplementados apresentaram maior expressão de RNA mensageiro (RNAm) de IL-10. Esplenócitos de animais não suplementados quando estimulados com células de *S. boulardii*, DNA e sobrenadante de cultivo também apresentaram maior expressão de RNAm de IL-10, sugerindo que esta citocina exerce papel na modulação da resposta mediada pelo probiótico (ROOS et al., 2009).

O efeito imunomodulador de *B. toyonensis* e *S. boulardii* também foi observado em ovinos que receberam uma vacina contra BoHV-5 e contra uma bacterina de *E. coli*, ambos os probióticos incrementaram a resposta imune humoral dos animais. *Saccharomyces boulardii* induziu maior soroconversão a bacterina (*E. coli*), enquanto, *B. toyonensis* induziu maior soroconversão contra BoHV-5. Sugerindo que o efeito modulador na resposta imune pode depender das características do probiótico e do tipo de antígeno administrado (ROOS et al., 2010).

Camundongos vacinados com uma vacina experimental inativada contra BoHV-5 e suplementados com *B. toyonensis*, apresentaram níveis de IgG aumentados, expressão de RNAm de IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-10. Após a suspensão da suplementação com probiótico, animais que receberam uma terceira dose da vacina apresentaram níveis de IgG maiores que os não suplementados. O efeito imunomodulador de *B. toyonensis* pode ocorrer no momento da primeira sensibilização com o antígeno vacinal. Este efeito pode ser mediado pelas células de memória que vão responder de forma mais eficiente a subseqüentes encontros com o antígeno. A suplementação com *B. toyonensis* pode ser um método potencial para aumentar a eficácia de vacinas através da modulação da resposta imune mediada por este probiótico (ROOS et al., 2012).

O probiótico *S. boulardii* apresentou efeitos positivos em camundongos infectados experimentalmente com *Toxocara canis*. *Saccharomyces boulardii* reduziu a intensidade da infecção em camundongos com toxocaríase (AVILA et al., 2012). Um estudo *in vitro* mostrou que o efeito protetor não é causado pela ação

direta do microrganismo sobre as larvas do parasito, sugerindo que a interação com a mucosa intestinal é necessária para o desenvolvimento do efeito protetor de *S. boulardii* (AVILA et al., 2013). A suplementação de camundongos com *S. boulardii* promoveu modulação na expressão das citocinas IL-12, IL-17 em camundongos infectados por *T. canis*. O efeito protetor de *S. boulardii* observado sugere que ocorre a estimulação de células que atuam na imunidade inata modulando a expressão das citocinas IL-12, IL-17 e IFN- $\gamma$  (AVILA, 2013).

#### **2.4 *Bacillus* sp. como adjuvantes de vacinas**

Os adjuvantes são definidos como agentes que estimulam o sistema imune, aumentam, modulam e prolongam a imunogenicidade dos antígenos co-administrados, aumentando assim a eficácia da vacina (REED et al., 2008). Os adjuvantes são considerados compostos heterogêneos que atuam como sistemas de entrega de antígeno, agregando e controlando a liberação do antígeno de forma lenta para serem apresentados pelas APCs, tais como os sais minerais, emulsões e lipossomas. Podem ainda atuar como imunopotencializadores ativando e potencializando a resposta imune inata através dos PRRs, como por exemplo, as citocinas, saponinas e agonistas de receptores TLRs (MONTOMOLI et al., 2011; PASHINE; VALIANTE; ULMER, 2005; O'HAGAN & VALIANTE, 2003).

Estudos tem demonstrado o potencial de *Bacillus firmus* como adjuvante de mucosa de vacinas virais. *Bacillus firmus* não é patogênico, não produz esporos e tem propriedades imunomoduladoras (ZIDEK et al, 1998; PROKEŠOVA et al., 1994; MARA et al., 1992). Bactérias vivas e inativadas administradas em pequenas e altas doses a camundongos foram bem toleradas. O efeito imunomodulador de *B. firmus* na formação de anticorpos é antígeno específico, quando administrado pelas vias intranasal e intratraqueal (MLČKOVÁ et al., 2001; PROKEŠOVA et al., 1998). Camundongos vacinados com vírus *Influenza* inativado associado com *B. firmus* como adjuvante de mucosa demonstraram níveis aumentados de IgM, IgG e IgA (Peter et al., 2008). Este microrganismo como adjuvante de mucosa promoveu elevados níveis de expressão dos genes das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-10 e interferon de tipo I em camundongos imunizados com o vírus influenza tipo A inativado, sugerindo seu potencial em estimular a resposta imune inata e adaptativa (ZANVIT et al., 2010).

Esporos de *B. subtilis* apresentam potencial como adjuvante de vacinas. Barnes et al. (2007) demonstraram que esporos deste microrganismo podem ser usados como adjuvantes de vacinas de mucosa e administrados pela via parenteral sem a necessidade de conjugação química do esporo com o antígeno. Antígenos proteicos podem ser adsorvidos na parede dos esporos em condições de baixo pH por interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre o esporo e o imunógeno. Camundongos imunizados pela via oral e nasal com antígenos adsorvidos a esporos de *B. subtilis* tornaram-se protegidos contra o desafio com a toxina do tétano e com a toxina alfa de *Clostridium perfringens* (HUANG et al., 2010).

Souza et al. (2014) demonstraram que a co-administração de esporos de *B. subtilis* com a proteína recombinante p24 gag de HIV estimulou a imunogenicidade do antígeno, promovendo aumento de anticorpos após a administração em camundongos pela via subcutânea. No estudo *in vitro* os esporos promoveram a ativação de APCs e aumento de expressão de MHC e CD40. Os esporos estimularam o aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas DCs murinas. Além disso, estudos *in vivo* indicaram um papel direto da imunidade inata nas propriedades imunomoduladoras dos esporos, pois linhagens de camundongos *knockout* MyD88 e TLR2 apresentaram ausência de efeitos adjuvantes mediados pelos esporos. O efeito adjuvante dos esporos é mediado pela via de sinalização que utiliza a molécula adaptadora MyD88, e possivelmente pelo reconhecimento do peptidoglicano via TLR2.

Recentemente Aps et al. (2015) mostraram que esporos de *B. subtilis* podem ser utilizados também como adjuvante de vacina de DNA. Um estudo *in vitro* demonstrou que os esporos de *B. subtilis* promoveram a ativação de DCs e induziram a migração de células pró-inflamatórias após a administração parenteral em camundongos. Camundongos imunizados com a vacina de DNA, que codifica a proteína E7 do papilomavírus humano tipo 16, quando co-administrada com esporos tiveram maior ativação de linfócitos T CD8+ antígenos específicos.

## **2.5 Glicoproteína D de herpesvírus bovino tipo 5**

A glicoproteína D (gD) está presente no envelope viral do herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5), que são importantes patógenos de bovinos (ENGELS; ACKEMANN; 1996; VOGEL et al., 2003). A gD de

BoHV-5 é essencial para a ligação e penetração do vírus nas células permissivas, sendo um dos principais alvos da resposta imune do hospedeiro induzindo uma forte resposta imune humoral e celular durante a infecção (DUMMER; LEITE; VAN DRUNET DEN HURK, 2014). Nas células do hospedeiro a gD se liga nos receptores das famílias do fator de necrose tumoral, como o nectin 1 e nectin 2 (GERAGHTY et al., 2000; MONTGOMERY et al., 1996).

A gD é importante na neutralização viral e na geração da resposta imune, é alvo das células NK, pois é uma das primeiras proteínas a serem expostas na membrana plasmática da célula infectada (BABIUK, 2003). Anticorpos anti-gD podem estimular a citotoxicidade celular mediada por anticorpo (ADCC). O papel da gD no estágio inicial da infecção pelo BoHV-1 e BoHV-5 e a sua abundância no envelope viral faz dela um importante alvo para a resposta imune do hospedeiro (BABIUK; DEN HURK; TIKOO, 1996).

Dummer et al. (2009) relataram a expressão da gD recombinante (rgD) de BoHV-5 na levedura metilotrófica *Pichia pastoris* e demonstraram a sua antigenicidade e imunogenicidade. Além disso, a rgD conserva propriedades similares a gD nativa de BoHV-5. A glicoproteína D recombinante de BoHV-5 quando associada com adjuvantes oleosos induziu anticorpos neutralizantes contra o vírus em camundongos (DUMMER et al., 2014) e em bovinos (ARAÚJO, 2014). Anticorpos neutralizantes contra o vírus constituem umas das mais importantes correlações da proteção clínica contra BoHV-1 e BoHV-5. Assim a construção de uma vacina recombinante formulada com um adjuvante que estimula o desenvolvimento de uma resposta imune balanceada pode induzir uma forte resposta imune humoral e celular (DUMMER; LEITE; VAN DRUNET DEN HURK, 2014).

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Estudar o efeito imunomodulador de *Bacillus toyonensis* em camundongos vacinados com a glicoproteína D recombinante de herpesvírus bovino tipo 5.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Avaliar a modulação da resposta imune nos camundongos vacinados contra BoHV-5 e suplementados com o probiótico *Bacillus toyonensis* em dois períodos diferentes;

Avaliar o efeito imunológico dos esporos viáveis de *Bacillus toyonensis* inoculados pela via subcutânea simultaneamente a vacina;

Avaliar o efeito imunológico dos esporos inativados de *Bacillus toyonensis* inoculados pela via subcutânea simultaneamente a vacina;

Avaliar o efeito imunológico dos esporos viáveis e inativados de *Bacillus toyonensis* associado ao antígeno vacinal.

## 4 Material e Métodos

### 4.1 Produção do probiótico

O probiótico *B. toyonensis* utilizado neste experimento pertence à coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia do Núcleo de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). O microrganismo foi semeado em meio Brain Heart Infusion Agar (ágar BHI, Acumedia), incubado a 37 °C durante 24 horas. Após o crescimento de colônias isoladas, foram inoculadas 3-5 colônias em Erlenmeyers de 500mL, contendo 100mL de meio Brain Heart Infusion Broth (caldo BHI, Acumedia). Estes foram incubados em agitador orbital à 200rpm, permanecendo de 16 a 18 horas. Os cultivos serviram de inóculo para biorreator contendo 3,5 L de meio NYSM (YOUSTEN, 1984). As condições do processo de fermentação foram controladas, o fornecimento de ar foi mantido entre 0,5 (v/v) a 1,5 (v/v) para que durante o processo fosse obtido aproximadamente 80% de oxigênio dissolvido no meio. A agitação foi mantida a 300rpm e a temperatura a 37 °C durante 96 horas, sem ajuste de pH durante o processo.

No final das 96 horas ou quando 90% das bactérias haviam esporulado, o cultivo foi centrifugado, em centrífuga Sorvall® RC™, a 5000 x g durante 20 minutos a 4 °C e concentrado a um volume de 500mL. A suspensão final foi aquecida 80 °C em banho maria durante 15 minutos para eliminar as formas vegetativas da bactéria. A concentração de *B. toyonensis* obtida nestes experimentos foi de aproximadamente  $2 \times 10^7$  UFC/mL. O controle de pureza foi realizado em todas as etapas do processo por esfregaço bacteriano utilizando a coloração de Gram e através de semeadura por esgotamento em ágar BHI.

O probiótico *B. toyonensis* foi adicionado na ração comercial isenta de quimioterápicos (Nuvilab® CR-1, Nuvital Nutrientes S/A) oferecida aos camundongos. A ração foi previamente triturada, em triturador de alimentos TR002 (MVithory LTDA-ME), e adicionado  $1 \times 10^9$  UFC de *B. toyonensis* por kg de ração, foi realizada a homogeneização e os *pellets* preparados e mantidos em estufa de circulação de ar durante 72 horas a temperatura de 40 °C. A ração foi armazenada a

temperatura ambiente até o momento da administração aos animais. O título do probiótico na ração foi em média de  $1 \times 10^6$  esporos viáveis de *B. toyonensis* gr<sup>-1</sup>. A titulação da ração foi realizada semanalmente pela técnica de diluição seriada e semeadura em ágar BHI para confirmar a permanência do título do microrganismo na ração.

## 4.2 Animais

Foram utilizados 56 camundongos *Swiss*, fêmeas de 4 a 6 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da UFPel. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno de 414X344X168mm autoclaváveis (ALESCO, Brasil), sem restrição de alimentação ou água. Todos os procedimentos realizados estão de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPel (projeto número 1981).

## 4.3 Suplementação dos animais

Os animais foram divididos aleatoriamente em oito grupos experimentais, com sete camundongos em cada grupo, denominados rgD+PBS, rgD+Al(OH)<sub>3</sub>, B.t integral, B.t 7dias, Esp vivo s.c., Esp inat s.c., Esp vivo+rgD, Esp inat+rgD. A tabela 1 apresenta a distribuição dos grupos experimentais. Os camundongos começaram a receber a ração com ou sem adição do probiótico sete dias antes do início do experimento para a adaptação a respectiva ração. O grupo B.t integral recebeu a suplementação com o probiótico durante todo o período do experimento. O grupo B.t 7dias recebeu a suplementação com o probiótico durante sete dias, antes de receber a primeira dose da vacina. O grupo Esp vivo s.c. recebeu  $2 \times 10^3$  UFC de esporos viáveis de *B. toyonensis* pela via subcutânea (s.c.) simultaneamente a vacina. O grupo Esp inat s.c. recebeu  $2 \times 10^3$  UFC de esporos de *B. toyonensis* inativados (durante 20 minutos a 121 °C) pela via s.c. simultaneamente a vacina. O grupo Esp vivo+rgD recebeu  $2 \times 10^3$  UFC de esporos viáveis de *B. toyonensis* associado com o antígeno vacinal. O grupo Esp inat+rgD recebeu  $2 \times 10^3$  UFC de esporos de *B. toyonensis* inativados associado com o antígeno vacinal. Os grupos rgD+Al(OH)<sub>3</sub>, rgD+PBS foram os controles não receberam suplementação nem

inoculação pela via s.c. de esporos de *B. toyonensis*. A figura 1 mostra o delineamento experimental.

Tabela 1 – Distribuição dos grupos experimentais utilizados no trabalho

Grupo	Probiótico	Período de suplementação	Vacina
rgD+PBS	Sem suplementação		rgD+PBS
rgD+Al(OH) <sub>3</sub>	Sem suplementação		rgD+Al(OH) <sub>3</sub>
B.t integral	Com suplementação	Integral	rgD+Al(OH) <sub>3</sub>
B.t 7dias	Com suplementação	-7 ao 0 dia	rgD+Al(OH) <sub>3</sub>
Esp vivo s.c.	2x10 <sup>3</sup> UFC esporos vivos	Dia 0 e 21	rgD+Al(OH) <sub>3</sub>
Esp inat s.c.	2x10 <sup>3</sup> UFC esporos inativ.	Dia 0 e 21	rgD+Al(OH) <sub>3</sub>
Esp vivo+rgD			rgD+Esp vivo
Esp inat+rgD			rgD+Esp inat

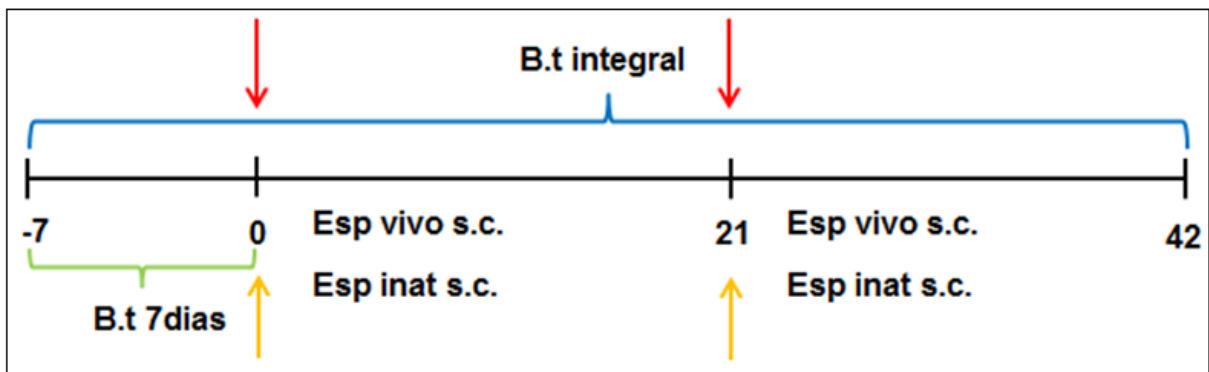


Figura 1 – Delineamento experimental. A linha escura representa o período do experimento em dias. O dia zero foi estabelecido como o dia da primeira vacinação. As setas vermelhas indicam os dias das vacinações. As setas amarelas indicam o dia das inoculações de *B. toyonensis* nos grupos Esp vivo s.c. e Esp inat s.c. As chaves indicam o período de suplementação com o probiótico nos grupos B.t integral (azul) e B.t 7 dias (verde).

#### 4.4 Vacinas

As vacinas foram formuladas utilizando a glicoproteína D recombinante (rgD) de herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) expressa na levedura *Pichia pastoris* (DUMMER et al., 2009). Para formular a vacina foi utilizado 40µg de rgD por dose em solução salina fosfatada (PBS) e adsorvidas em 10% de Hidróxido de Alumínio (Al(OH)<sub>3</sub>) como adjuvante. Para preparar a dose do antígeno associado com esporos viáveis foi utilizado 40µg de rgD associada com 10<sup>4</sup> UFC/mL de esporos viáveis de *B. toyonensis*. Para preparar a dose do antígeno adicionado com esporos inativados, uma suspensão contendo 2x10<sup>3</sup> UFC de esporos viáveis foi autoclavada a 121°C durante 20 minutos e depois associada com 40µg de rgD. Foram administradas duas



doses de vacina, contendo volume de 200 $\mu$ L, pela via s.c. no dia 0 e 21 do experimento.

#### 4.5 Coleta de sangue

As amostras de sangue dos camundongos foram colhidas a partir do seio venoso retro orbital nos dias 0, 14, 28 e 42 do experimento. Após a coleta as amostras de sangue foram centrifugadas e o soro separado, identificadas individualmente e armazenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento de realização das análises.

#### 4.6 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

O ELISA indireto foi realizado segundo Dummer et al. (2014) com modificações. Os soros foram testados para IgG total, IgG1 e IgG2a. As análises foram realizadas com soro animal individual de cada grupo e com o *pool* dos soros dos animais de cada grupo, coletados nos dias 0, 14, 28 e 42 do experimento. Nas análises com soro individual estes foram diluídos 1:400. Para realizar a titulação, as amostras de soro em *pool* do dia 42 foram diluídas em série na base 2 iniciando em 1:100 até 1:102.400. Placas de microtitulação de 96 poços foram sensibilizadas com 25ng de rgD por poço, permanecendo durante a noite a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As placas foram lavadas três vezes com 200 $\mu$ L por poço de PBS (pH 7,4) contendo 0,05 % de Tween 20 (PBS-T). Posteriormente foram adicionados 100 $\mu$ L por poço de cada amostra de soro diluída 1:400 em PBS-T e as placas foram incubadas durante 1 hora, a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após três lavagens com 200  $\mu$ L de PBS-T por poço, foi adicionado 100 $\mu$ L por poço de conjugado de anticorpos IgG anti-mouse (Sigma-Aldrich, SP) diluído 1:4.000 em PBS, seguido por incubação a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora e meia. Após cinco lavagens nas mesmas condições anteriores, foi adicionado 100  $\mu$ L por poço de solução de revelação (10mL de tampão para substrato, 0,004g de Ortho-Phenylenediamine (OPD) e 15 $\mu$ L de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) deixando reagir por 15 minutos no escuro a temperatura ambiente. A reação foi interrompida adicionando-se 50  $\mu$ L por poço de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N. As absorbâncias foram medidas a 492 nm usando-se um leitor de microplacas (Thermoplate, SP, Brasil). Os resultados da titulação foram expressos como o recíproco da diluição mais elevada, que resultou em absorbâncias de três desvios

padrão acima do valor do soro controle negativo. Para isotipagem de IgG1 e IgG2a, foram utilizados *pools* de soros dos grupos experimentais diluídos 1:2.000. A técnica foi realizada de acordo com as instruções do kit de isotipagem (Sigma – Aldrich). Os resultados foram expressos como a média das absorvâncias obtidas das amostras em triplicata.

#### **4.7 Soroneutralização**

As amostras de soros dos grupos experimentais foram testadas para a presença de anticorpos neutralizantes contra o BoHV-5 através da técnica de soroneutralização (SN), segundo Fischer et al. (2007). Um *pool* dos soros de cada grupo foi diluído em série na base 2, iniciando em 1:2 até 1:256 em meio essencial mínimo (MEM). Em seguida, 25µL de cada diluição foram distribuídos em placas de poliestireno de 96 orifícios. Após a distribuição do soro diluído em cada orifício, foram adicionados 25µL de uma suspensão de vírus BoHV-5 contendo 100 CCID50%, seguido de incubação durante 1 hora a 37 °C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, foram adicionadas 3X10<sup>4</sup> células MDBK por orifício. As microplacas foram novamente incubadas durante 72 horas. A presença de anticorpos neutralizantes resultou na ausência de efeito citopático. Os títulos de anticorpos foram calculados pelo método estatístico de Behrens e Kärben e expressos como o recíproco da diluição mais elevada capaz de neutralizar 100 CCID50% do vírus.

#### **4.8 Análise estatística**

Os dados foram analisados com auxílio do programa estatístico GraphPad prism 5.03 (GraphPad Software, CA, USA). As triplicatas das absorvâncias dos soros dos animais de cada grupo experimental, obtidas pelo ELISA indireto, foram submetidas a análise de variância (two-way ANOVA). As diferenças entre as médias de absorvâncias foram analisadas pelo teste de Bonferroni (Bonferroni posttest) e considerou-se que houve a diferença entre médias quando  $p \leq 0,05$ .

## 5 Resultados

Os animais de todos os grupos responderam a vacina com a produção de anticorpos. A Figura 2 mostra a dinâmica dos níveis totais de IgG nos grupos. Os grupos experimentais suplementados com *B. toyonensis* (B.t integral, B.t 7dias, Esp vivo s.c., Esp inat s.c.) apresentaram níveis de IgG superiores ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos grupos não suplementados (rgD+PBS, rgD+Al(OH)<sub>3</sub>) nos dias 28 e 42 do experimento, demonstrando a modulação da resposta imune humoral mediada pelo probiótico. Os animais que receberam a suplementação com o probiótico durante o período integral do experimento apresentaram níveis de IgG mais elevados quando comparados aos outros grupos (Figura 2A). Quando se avaliou o período de suplementação na modulação da resposta imune humoral, observou-se que os animais suplementados com o probiótico durante sete dias antes da primeira dose da vacina mostraram níveis de IgG maiores quando comparados aos não suplementados, porém, quando comparados aos animais suplementados no período integral apresentaram níveis de anticorpos menores (Figura 2B). Os grupos experimentais que receberam, respectivamente, a inoculação de  $2 \times 10^3$  UFC de esporos vivos (Esp vivo s.c.) e de esporos inativados (Esp inat s.c.) pela via s.c. simultaneamente a vacina, apresentaram níveis superiores de IgG quando comparados aos grupos não suplementados, porém, apresentaram resultados inferiores ( $p > 0,05$ ) aos animais suplementados com o probiótico no período integral. Não houve diferença nos níveis de IgG entre o grupo que recebeu a inoculação de esporos vivos e o que recebeu a inoculação de esporos inativados (Figura 2C). Os grupos experimentais (Esp vivo+rgD e Esp inat+rgD) que receberam, respectivamente, associação do antígeno vacinal com  $2 \times 10^3$  UFC de esporos vivos e de esporos inativados apresentaram níveis de IgG menores quando comparados aos grupos suplementados com o probiótico e ao grupo não suplementado que recebeu a rgD com o adjuvante Al(OH)<sub>3</sub> (Figura 2D).

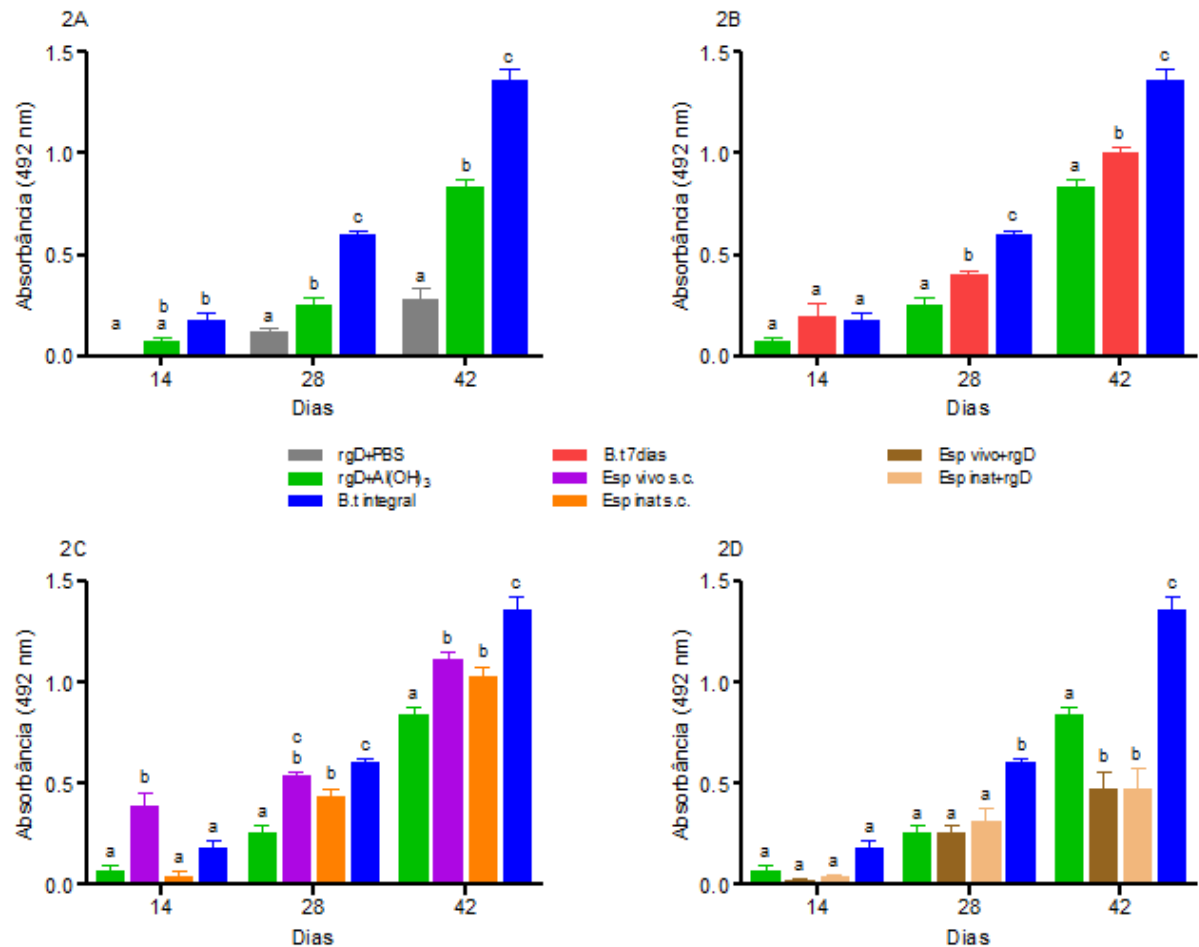


Figura 2 – Dinâmica dos níveis totais de IgG em camundongos vacinados com a rgD de BoHV-5 e suplementados com *B. toyonensis*. Os dados representam as médias ( $\pm$  erro padrão da média) dos valores de absorvâncias obtidas pelo ELISA indireto dos soros coletados nos dias 14, 28 e 42. (A) Níveis de IgG dos grupos experimentais rgD+PBS, rgD+Al(OH)<sub>3</sub> e B.t integral. (B) Níveis de IgG dos grupos experimentais rgD+Al(OH)<sub>3</sub>, B.t 7 dias e B.t integral. (C) Níveis de IgG dos grupos experimentais rgD+Al(OH)<sub>3</sub>, Esp vivo s.c., Esp inat s.c. e B.t integral. (D) Níveis de IgG dos grupos experimentais rgD+Al(OH)<sub>3</sub>, Esp vivo+rgD, Esp inat+rgD e B.t integral. As letras iguais significam que não há diferença estatística ( $p > 0,05$ ) e letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos pelo teste two-way anova seguido pelo teste de Bonferroni nos dias 14, 28 e 42 do experimento.

Na titulação dos níveis totais de IgG no dia 42, todos os animais suplementados com *B. toyonensis* apresentaram títulos de IgG superiores em relação aos animais não suplementados. A figura 3 mostra a dinâmica da titulação dos níveis totais de IgG, ou seja, a maior diluição do soro na qual ainda foram detectados anticorpos anti-rgD. Animais suplementados com o probiótico durante o período integral apresentaram títulos de anticorpos (51200) quatro vezes maiores quando comparados aos animais não suplementados (Figura 3A). Quando se avaliou a suplementação com o probiótico durante sete dias antes da primeira dose da vacina observou-se que este grupo apresentou títulos (25600) duas vezes

maiores em relação aos animais não suplementados (Figura 3B). Os animais que receberam a inoculação de  $2 \times 10^3$  UFC de esporos vivos (Esp vivo s.c.) simultaneamente a vacina apresentaram títulos (51200) quatro vezes maiores quando comparados aos animais não suplementados, este grupo experimental obteve títulos iguais ao grupo suplementado com o probiótico durante o período integral. Os animais que receberam a inoculação de  $2 \times 10^3$  UFC de esporos inativados (Esp inat s.c.) apresentaram títulos (25600) duas vezes menores quando comparados aos animais que receberam a inoculação de esporos vivos (Figura 3C). Os animais que receberam, respectivamente, a associação da rgD com os esporos vivos e inativados (Esp vivo+rgD e Esp inat+rgD) apresentaram títulos (3200/1600) menores que os grupos suplementados com o probiótico e ao grupo não suplementado que recebeu a rgD com o adjuvante  $Al(OH)_3$  (Figura 3D).

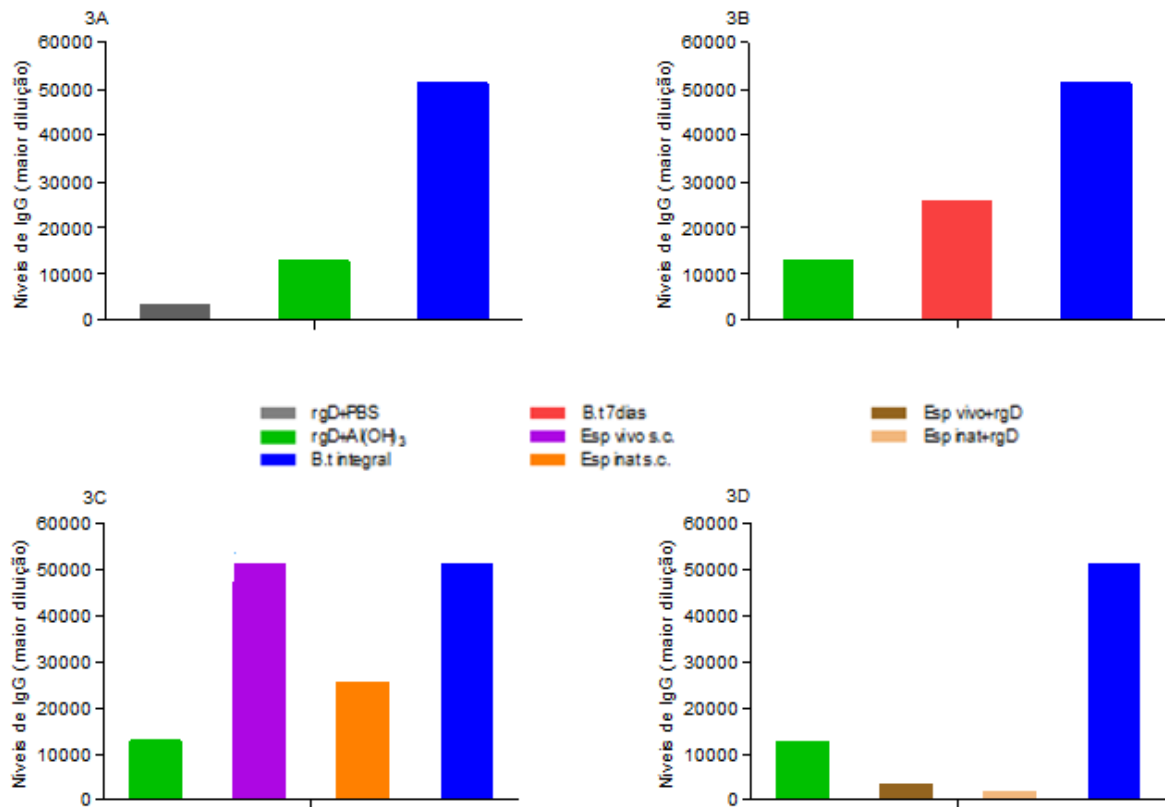


Figura 3 – Titulação dos níveis totais de IgG em camundongos vacinados com a rgD de BoHV-5 e suplementados com *B. toyonensis*. Os dados representam as médias ( $\pm$  E.P.M) dos valores expressos como a maior diluição dos soros obtida pelo ELISA indireto do dia 42 do experimento. (A) Níveis de IgG dos grupos experimentais rgD+PBS, rgD+Al(OH)<sub>3</sub> e B.t integral. (B) Níveis de IgG dos grupos experimentais rgD+Al(OH)<sub>3</sub>, B.t 7dias e B.t integral. (C) Níveis de IgG dos grupos experimentais rgD+Al(OH)<sub>3</sub>, Esp vivo s.c., Esp inat s.c. e B.t integral. (D) Níveis de IgG dos grupos experimentais rgD+Al(OH)<sub>3</sub>, Esp vivo+rgD, Esp inat+rgD e B.t integral.

O perfil de isotipos IgG foi determinado nos dias 28 e 42 do experimento. A figura 4 mostra o perfil de isotipos de imunoglobulinas IgG1 e IgG2a. Todos os animais suplementados com *B. toyonensis* apresentaram maiores níveis de IgG1 e IgG2a quando comparados aos animais não suplementados ( $p < 0,05$ ). Foi observada uma tendência de aumento dos níveis tanto IgG1 quanto de IgG2a do dia 28 para o dia 42 (Figura 4A e 4B).

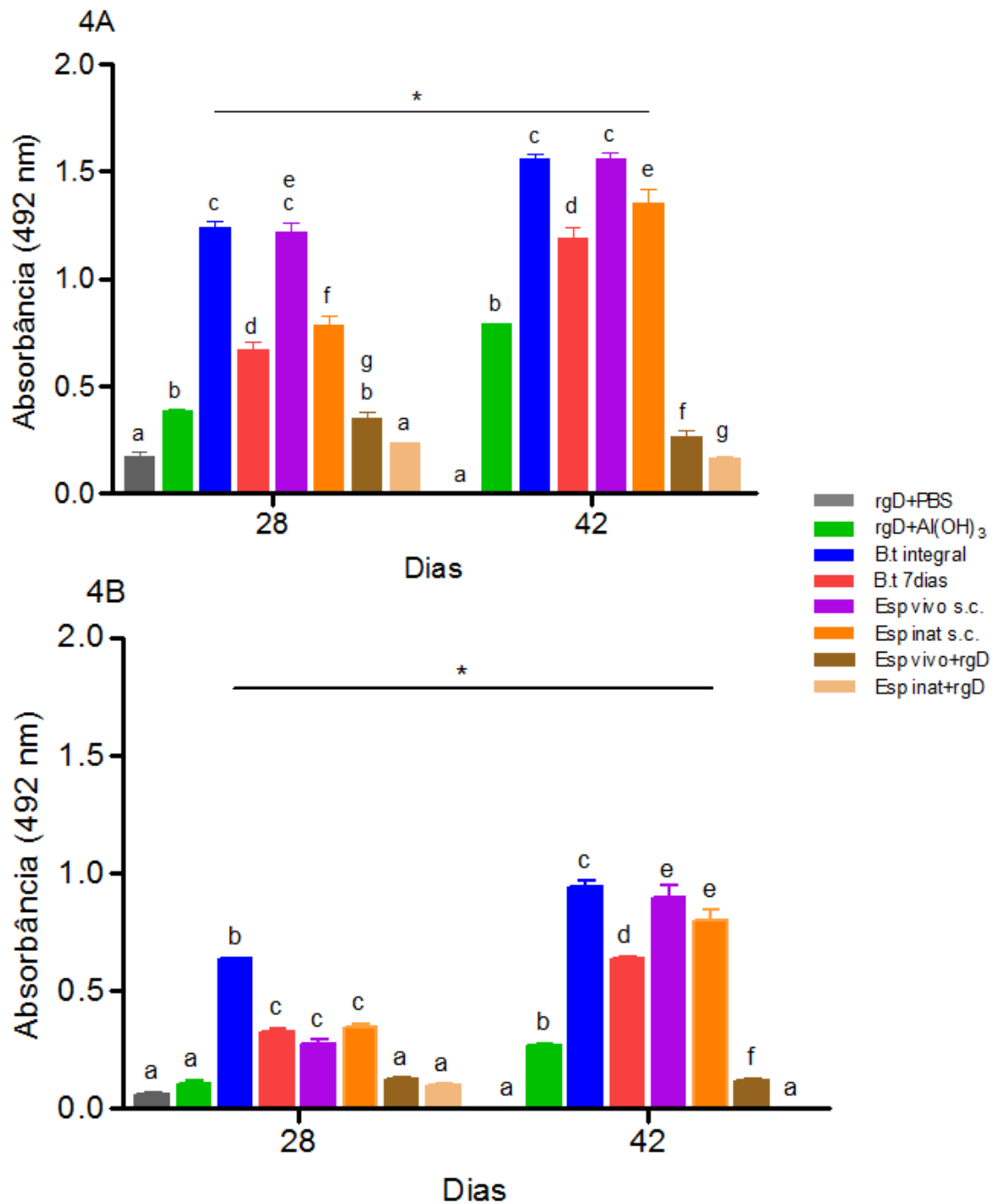


Figura 4 – Perfil de isotipos de imunoglobulinas em camundongos vacinados com a rgD de BoHV-5 e suplementados com *B. toyonensis*. Os dados representam as médias ( $\pm$  E.P.M) dos valores de absorbâncias obtidas pelo ELISA indireto dos soros coletados dos animais nos dias 28 e 42 do experimento (A) Níveis de IgG1. (B) Níveis de IgG2a dos grupos experimentais rgD+PBS, rgD+Al(OH)<sub>3</sub>, B.t integral, B.t 7dias, Esp vivo s.c., Esp inat s.c., Esp vivo+rgD, Esp inat+rgD. As letras iguais significam que não há diferença estatística ( $p > 0,05$ ) e letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos nos dias 28 e 42. O asterisco representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) nos níveis de IgG1 e IgG2a entre o dia 28 e o dia 42 do experimento pelo teste two-way anova seguido pelo teste de Bonferroni.

A modulação da resposta imune mediada pelo probiótico também foi observada nos títulos de anticorpos neutralizantes contra BoHV-5. A tabela 2 apresenta os títulos de anticorpos neutralizantes nos grupos experimentais determinados no dia 28 e 42 do experimento. O grupo experimental não suplementado com o probiótico que recebeu a rgD com PBS não apresentou anticorpos neutralizantes. O grupo vacinado com a rgD e o adjuvante Al(OH)<sub>3</sub> apresentou título 4 no dia 28 mantendo o mesmo título no dia 42. Foi observado que a suplementação com o probiótico durante o período integral estimulou a produção de títulos de anticorpos iguais aos títulos estimulados pela inoculação dos esporos vivos simultaneamente a vacina nos dias 28 e 42 (16 e 32, respectivamente). Os títulos de anticorpos nos animais suplementados no período de sete dias antes da primeira dose da vacina foram similares aos dos animais que receberam inoculação de esporos inativados simultaneamente a vacina nos dias 28 e 42 (4 e 8, respectivamente). A associação da rgD com os esporos vivos ou inativados não estimulou a produção de anticorpos neutralizantes contra o BoHV-5.

Tabela 2 – Títulos de anticorpos neutralizantes em camundongos vacinados com a rgD de BoHV-5 e suplementados com *B. toyonensis*. Os dados representam os títulos de anticorpos neutralizantes contra BoHV-5 determinados pela técnica de soroneutralização dos soros do dia 28 e 42 do experimento.

Grupos Experimentais	Títulos de anticorpos neutralizantes	
	Dia 28	Dia 42
rgD+PBS	0	0
rgD+Al(OH) <sub>3</sub>	4	4
B.t integral	16	32
B.t 7dias	4	8
Esp vivo s.c.	16	32
Esp inat s.c.	4	8
Esp vivo+rgD	0	0
Esp inat+rgD	0	0



## 6 Discussão

Neste trabalho observamos o efeito modulador de *B. toyonensis* na resposta imune de camundongos vacinados com a rgD de BoHV-5, suplementando na alimentação em dois períodos diferentes e administrando via s.c. simultaneamente a vacina. Este microrganismo é utilizado há várias décadas como probiótico na alimentação animal melhorando a eficiência alimentar e provendo benefícios a saúde animal (GIL-TURNES; CONCEIÇÃO; GIL DE LOS SANTOS, 2007).

Camundongos vacinados com uma bacterina tetravalente de *E. coli*, este probiótico estimulou um aumento significativo nos níveis de IgG, quando comparados aos camundongos não suplementados, demonstrando-se como adjuvante da imunidade humoral (CONCEIÇÃO et al., 2002). Coppola et al. (2005) observaram que a suplementação com *B. toyonensis* induziu soroconversões mais altas em camundongos vacinados com uma vacina contra o parvovírus canino, em relação aos animais não suplementados, estimulando o prosseguimento dos estudos com probióticos como imunomoduladores em outras espécies animais.

No presente trabalho todos os grupos experimentais suplementados com *B. toyonensis* apresentaram níveis de IgG aumentados quando comparados aos grupos não suplementados, demonstrando a modulação da resposta imune humoral mediada pelo probiótico (Figura 2A). Resultados similares foram descritos em camundongos que receberam este probiótico na alimentação e foram vacinados com uma vacina experimental inativada contra BoHV-5 (ROOS et al., 2012). A modulação imunológica mediada por este probiótico foi observada em outras espécies animais como suínos e ovinos. Em leitões vacinados com vacinas inativadas contra *Mycoplasma* e *Influenza*, a suplementação com *B. toyonensis* estimulou o aumento dos títulos de anticorpos e de populações de linfócitos (SHIERACK, et al., 2007). Em cordeiros suplementados com este probiótico e vacinados com uma vacina inativada contra BoHV-5 e com a *E. coli* K88ab observou-se um incremento da resposta imune humoral com o aumento de títulos de anticorpos contra ambos os antígenos (ROOS et al., 2010).

Quando foi avaliado o período da suplementação na modulação da resposta imune dos animais que receberam o probiótico durante sete dias antes de receber a primeira dose da vacina, este grupo apresentou níveis de IgG maiores quando comparados aos não suplementados (Figura 2B). Esta observação sugere que o probiótico é capaz de modular a resposta imune mesmo quando não é administrado de forma contínua aos animais. ROOS et al. (2012) sugeriram que o efeito imunomodulador de *B. toyonensis* pode ocorrer no momento da primosensibilização, durante o primeiro contato com o antígeno na primeira dose da vacina, e que este efeito poderia ser mediado pela estimulação de células de memória que respondem de forma mais eficiente a encontros subsequentes com o antígeno. A partir de nossos resultados podemos sugerir que a suplementação com o microrganismo no momento da primeira dose da vacina é importante na modulação da resposta imune contra o antígeno, resultando em níveis de IgG superiores aos animais não suplementados, confirmando o efeito imunomodulador do probiótico.

Neste trabalho os animais receberam o probiótico na quantidade  $1 \times 10^6$  esporos viáveis de *B. toyonensis*  $\text{gr}^{-1}$  de ração. Na mucosa intestinal estes esporos podem germinar tornando-se células bacterianas viáveis (CASULA & CUTTING, 2002). *Bacillus toyonensis* possui na constituição da sua parede celular peptidoglicano e ácido lipoteicoico que podem ser reconhecidos como PAMPs pelos receptores TLR2 e TLR4 das DCs presentes nos tecidos linfóides associados à mucosa intestinal promovendo a maturação e a expressão de moléculas co-estimuladoras nas DCs (LEEBER; VANDERLEYDEN; DE KEERSMAECKER, 2010). As DCs maturadas realizam a ativação de linfócitos T e a produção de citocinas que vão caracterizar a resposta imune desenvolvida. As DCs maturadas podem estimular a resposta imune sistêmica em locais distantes, como nos linfonodos onde está ocorrendo a apresentação do antígeno vacinal as células do sistema imune (HUANG et al., 2008). Isto sugere uma possível explicação do efeito imunomodulador do probiótico observado neste estudo.

O efeito modulador na resposta imune humoral observado pelos títulos de IgG nos grupos experimentais que receberam, respectivamente, a inoculação de esporos vivos e inativados pela via s.c. simultaneamente a vacina (Figura 2C) pode ser explicado, pois as DCs migram pelos tecidos linfóides periféricos. As células apresentadoras de antígenos, principalmente as DCs, podem entrar em contato com o antígeno vacinal e com o *B. toyonensis* no local de inoculação, migrarem para os

linfonodos regionais e apresentarem os antígenos aos linfócitos T virgens, estimulando a sua maturação em linfócitos T efetores (GERMAIN et al., 2006).

Na titulação dos níveis de IgG total no dia 42 do experimento (Figura 3C) observamos que os animais que receberam a inoculação de esporos vivos apresentaram maiores títulos do que os animais que receberam os esporos inativados. Os esporos possivelmente germinaram aumentando a ativação das DCs ou estimulando de modo diferenciado. Este fato já foi reportado anteriormente em meio de cultivo e no interior de células após a fagocitose (SOUZA et al., 2014; HUANG et al., 2008). Os esporos também podem estimular a imunidade inata, pois causam uma reação inflamatória no local da inoculação aumentando o acúmulo e a drenagem do líquido extracelular para a linfa, levando junto os esporos aos linfonodos (THERY & AMIGORENA, 2001). O ambiente onde as DCs e as outras APCs capturam e apresentam os antígenos e as citocinas produzidas, sinalizam a diferenciação da população de linfócitos T auxiliares e conseqüentemente o estabelecimento do tipo de resposta imune secundária (KALFAMMAN, 2007).

Os animais que receberam a rgD associada aos esporos vivos ou inativados apresentaram níveis de IgG inferiores aos grupos experimentais suplementados com o probiótico e ao grupo não suplementado que recebeu a rgD com o adjuvante  $Al(OH)_3$  (Figura 3D). O resultado observado em nosso trabalho pode ser explicado pela utilização de uma concentração menor de esporos ( $2 \times 10^3$  UFC por dose) do que a quantidade de esporos de outra espécie do gênero *Bacillus* usada como adjuvante de vacina em outro estudo. SOUZA et al. (2014) demonstraram o efeito adjuvante de  $2 \times 10^9$  esporos de *B. subtilis* associado a  $70 \mu g$  da proteína recombinante p24 gag do HIV administrada pela via s.c. em camundongos.

A modulação da resposta imune mediada por *B. toyonensis* neste estudo foi demonstrada também pelo perfil de isotipos de imunoglobulinas IgG1e IgG2a. Nos dias 28 e 42 do experimento foram observados maiores níveis de IgG1 nos animais suplementados, o que sugere a polarização de uma resposta Th2 (Figura 4A). Entretanto, no dia 42 observou-se um aumento significativo nos níveis de IgG2a em relação ao dia 28 (Figura 4B). Esta observação pode sugerir que com o passar das semanas ocorreu um incremento nos níveis de IgG2a, que indica o desenvolvimento de uma resposta imune mista Th1/Th2. Dummer et al. (2014) demonstraram que camundongos vacinados com a rgD de BoHV-5 associada com adjuvantes oleosos desenvolveram uma resposta balanceada Th1/Th2.

No presente trabalho utilizamos o adjuvante  $\text{Al}(\text{OH})_3$  na formulação da vacina. Os animais foram vacinados com a  $\text{rgD}+\text{Al}(\text{OH})_3$  e suplementados com o probiótico ou receberam a inoculação do microrganismo pela via s.c. simultaneamente a vacina. O  $\text{Al}(\text{OH})_3$  adsorve o antígeno as suas partículas realizando a liberação lenta do mesmo e a ingestão aumentada pelas APCs. Mori et al. (2012) demonstraram que adjuvantes baseados em sais de alumínio inibem a polarização da resposta Th1 pela inibição da secreção de IL-12. Em camundongos o  $\text{Al}(\text{OH})_3$  induz a polarização de uma forte resposta Th2 como isotipos IgG dependentes de linfócitos Th2. O mecanismo de adjuvantividade do  $\text{Al}(\text{OH})_3$  não está totalmente elucidado, ele aparenta atuar pelo estímulo do NLRP3 ativando o inflamassomo e a secreção de citocinas pro-inflamatórias (COFFMAN; SHER; SEDER; 2010; LI; SUBA; RE, 2007). Nossos resultados sugerem que o probiótico *B. toyonensis* pode modular a resposta imune vacinal para a polarização de uma resposta mista Th1/Th2, inibindo o efeito do  $\text{Al}(\text{OH})_3$  que tem tendência em direcionar a polarização de resposta Th2.

A suplementação com o probiótico *B. toyonensis* estimulou a produção de anticorpos neutralizantes contra o BoHV-5. Os anticorpos neutralizam o vírus bloqueando sua ligação aos receptores celulares impedindo a infecção das células permissivas. Após a vacinação contra um agente viral, anticorpos neutralizantes são necessários e podem ser suficientes para a proteção ou controle de infecções futuras (KLASSE, 2014). No dia 42 do experimento observamos que os grupos experimentais que receberam a suplementação com o probiótico durante o período integral e os que receberam a inoculação dos esporos via s.c. simultaneamente a vacina apresentaram maiores título de anticorpos neutralizantes (Tabela 2). Os animais que receberam o probiótico durante sete dias antes da primeira dose da vacina apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes inferiores, isto sugere que no momento da segunda dose da vacina o papel do probiótico é importante no desenvolvimento da resposta imune, no entanto, os títulos de anticorpos neutralizantes nestes animais foram superiores aos títulos dos animais não suplementados, demonstrando o efeito imunomodulador do probiótico mesmo com a suplementação somente antes da primo-vacinação.

Neste trabalho foi utilizado como antígeno vacinal a  $\text{rgD}$  de BoHV-5 para avaliar o efeito imunomodulador de *B. toyonensis*. O uso de vacinas baseadas em antígenos recombinantes é considerado seguro, pois vacinas recombinantes não causam reações adversas nos animais, entretanto, são pouco imunogênicos sendo

necessário o uso de adjuvantes para induzir uma resposta humoral e celular protetora (MBOW et al., 2010; REED et al., 2009). Os dados obtidos neste trabalho sugerem que o probiótico *B. toyonensis* apresenta efeito imunomodulador em camundongos vacinados com a rgD de BoHV-5 podendo constituir-se numa alternativa para aumentar a eficácia de vacinas recombinantes. As propriedades imunomoduladoras observadas com *B. toyonensis* abrem perspectivas para o estudo de seu potencial como adjuvante de vacinas.

## 7 Considerações Finais

- *Bacillus toyonensis* apresentou efeito imunomodulador em camundongos vacinados com a glicoproteína D recombinante de herpesvírus bovino tipo 5;
- O probiótico *B. toyonensis* é capaz de modular a resposta imune humoral mesmo não sendo administrado de forma contínua;
- A inoculação de esporos vivos ou inativados de *B. toyonensis* simultaneamente a vacina modulou a resposta imune humoral;
- O antígeno vacinal associado a  $2 \times 10^3$  UFC de esporos vivos ou inativados se mostrou ineficiente em estimular a resposta imune;
- *Bacillus toyonensis* estimulou o desenvolvimento de uma resposta mista Th1/Th2;
- *Bacillus toyonensis* estimulou maior produção de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 5.

## Referências

ANTUNOVIC, Z.; SPERANDA, M.; LIKER, B.; SERIC, V.; SENCIC, D.; DOMACINOVIC, M.; SPERANDA, T. Influence of feeding the probiotic pioneer PDFM® to growing lambs on performances and blood composition. **Acta Veterinaria**, Beograd, v.55, n.4, p.287-300, 2005.

APS, L. R.; DINIZ, M. O.; PORCHIA, B. F.; SALES, N. S.; MORENO, A. C.; FERREIRA, L. C. *Bacillus subtilis* spores as adjuvants for DNA vaccines. **Vaccine**, v.33, p.2328-2334, 2015.

ARAUJO, I. L. **Resposta imune humoral em bovinos induzida pela glicoproteína D recombinante de herpesvírus bovino tipo 5**. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, p.58, 2014. Disponível em [http://repositorio.ufpel.edu.br/bitstream/123456789/1235/1/dissertacao\\_itaua\\_leston\\_araujo.pdf](http://repositorio.ufpel.edu.br/bitstream/123456789/1235/1/dissertacao_itaua_leston_araujo.pdf).> Acesso em 15 de dezembro de 2015.

ASHRAF, R.; VASILJEVICA, T.; DAYB, S. L.; SMITHC, S. C.; DONKORA, O. N. Lactic acid bacteria and probiotic organisms induce different cytokine profile and regulatory T cells mechanisms. **Journal of Functional Foods**, v.6, p.395-409, 2014.

ÁVILA, F. A.; PAULILO, A. C.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; LUCAS, F. A.; ORGAZ, A.; QUITANA, J. L. Avaliação da eficiência de um probiótico no controle de diarreia e no ganho de peso de bezerros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.52, p.41-46, 2000.

AVILA, L. F. C. **Efeito imunomodulador de *Saccharomyces boulardii* em camundongos experimentalmente infectados por *Toxocara canis***. Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas, p.71, 2013. Disponível em <<http://repositorio.ufpel.edu.br/handle/123456789/2332>>. Acesso em 18 de novembro de 2015.

AVILA, L. F. C.; CONCEIÇÃO, F. R.; TELMO, P. L.; DUTRA, G. F.; SANTOS, D. G. *boulardii* reduces infection intensity of mice with toxocarasis. **Veterinary Parasitology**, v.187, p.337-40, 20.

AVILA, L. F. C.; TELMO, P. L.; MARTINS, L. H. R.; GLAESER, T. A.; CONCEIÇÃO, F. R.; LEITE, F. P. L.; SCAINI, C. J. Protective Effect Of The Probiotic *Saccharomyces Boulardii* In *Toxocara Canis* Infection Is Not Due To Direct Action On The Larvae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v.55, n.5, p.363-365, 2013.

BABIUK, L. A.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; TIKOO, S. L. Immunology of 21 Bovine Herpesvirus 1 infection. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.31-42, 1996.

BABIUK, L.A; VAN DRUNEN, L.D.H; TIKOO, S.K. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.31–42, 1996.

BARNES, A. G. C.; CEROVIC, V.; HOBSON, P. S.; KLAVINSKIS, L. S. *Bacillus subtilis* spores: A novel microparticle adjuvant which can instruct a balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen. **European Journal of Immunology**, v.37, p.1538-1547, 2007.

BAUM, B.; LIEBLER-TENORIO, E. M.; ENSS, M. L., POHLENZ, J. F.; BREVES, G. *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* influence the morphology and the mucins of the intestine of pigs. **Zeitschrift für Gastroenterologie**, v.40, p.277-284, 2002.

BENYACOUB, J.; CZARNECKI-MAULDEN, G. L.; CAVADINI, C.; SAUTHIER, T.; ANDERSON, R. E.; SCHIFFRIN, E. J.; VON DER WEID, T. Supplementation of Food with *Enterococcus faecium* (SF68) Stimulates Immune Functions in Young Dogs. **The Journal of Nutrition**, v.133, p.1158-1162, 2003.

BENYACOUB, J.; PÉREZ, P. F.; ROCHAT, F.; SAUDAN, K. Y.; REUTELER, G.; ANTILLE, N.; HUMEN, M.; DE ANTONI, G. L.; CAVADINI, C.; BLUM, S.; SCHIFFRIN, E. J. *Enterococcus faecium* SF68 Enhances the Immune Response to *Giardia intestinalis* in Mice. **Nutritional Immunology**, v.135, p.1171-1176, 2005.

BERMUDEZ-BRITO, M.; PLAZA-DÍAZ, J.; MUÑOZ-QUEZADA, S.; GÓMEZ-LLORENTE, C.; GIL, A. Probiotic Mechanisms of Action. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v.61, p.160-174, 2012.

BORCHERS, A. T.; SELMI, C.; MEYERS, F. J. KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. Probiotics and Immunity. **Journal of Gastroenterology**, v. 44, p.26-46, 2009.



BOULAY, J. L.; O'SHEA, J. J.; PAUL, W. E. Molecular Phylogeny within Type I Cytokines and Their Cognate Receptors. **Immunity**, v.19, p.159-163, 2003.

BRANDTZAEG, P. Mucosal Immunity: Induction, Dissemination, and Effector Functions. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.70, n.6, p.505-515, 2009.

CASTILLO, N. A.; PERDIGÓN, G.; LEBLANC, A. M. Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. **BioMed Central, Microbiology**, v.11, n.177, p.1-12, 2011.

CASULA, G.; CUTTING, S. M. *Bacillus* probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2344-2352, 2002.

CHANDLER, M. Probiotics – not all created equally. **Journal of Small Animal Practice**, v.55, p.439-441, 2014.

COFFMAN, R. L.; SHER, A.; SEDER, R. A. Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. **Immunity**, v.33, n.4, 2010.

CONCEIÇÃO, F. R.; ZANI, J. L.; GIL-TURNES, C. Effect of the Probiotic CenBiot on the Humoral Response to an *Escherichia coli* Bacterin. **Food and Agricultural Immunology**, v.14, p.133-138, 2002.

COPOLLA, M. M.; GIL-TURNES, C. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1297-1303, 2004.

COPPOLA, M. M.; CONCEIÇÃO, F. R.; GIL-TURNES, C. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. Toyoi on the humoral and cellular response of mice to vaccines. **Food and Agricultural Immunology**, Basingstoke, v.16, n.3, p.213-219, 2005.

CUEVAS, A. C.; GONZALÉZ, E. A.; HUGUENIN, M. T. S.; DOMINGUEZ, S. C. El efecto de *Bacillus toyoi* sobre el comportamiento productivo em polos de engorda. **Veterinaria México**, v.31, n.4, p.301-308, 2000.

CURTSINGER, J. M.; MESCHER, M. F. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. **Current Opinion in Immunology**, v.22, p.333-40, 2010.

CUTTING, S. M. Bacillus probiotics. **Food Microbiology**, v.28, p.214-220, 2011.

DEN HAAN, J. M.; ARENS, R.; VAN ZELMC, M. C. The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. **Immunology Letters**, v.162, p.103-112, 2014.

DUMMER, L. A.; ARAUJO, I. L.; FINGER, P. F.; SANTOS, A. G. J.; ROSA, M. C.; CONCEIÇÃO, F. R.; FISCHER, G. S.; VAN DRUNEN, L. D. H.; LEITE, F. P. L. Immune response in mice against recombinant bovine herpesvirus 5 glycoprotein D. **Vaccine**, v.32, p.2413-2419, 2014.

DUMMER, L. A.; CONCEICAO, F. R.; NIZOLI, L. Q.; DE MORAES, C. M.; ROCHA, A. R.; DE SOUZA, L. L.; ROOS, T.; VIDOR, T.; LEITE, F. P. L. Cloning and expression of a truncated form of envelope glycoprotein D of Bovine herpesvirus type 5 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Journal Virology Methods**, v.161, p.84-90, 2009.

DUMMER, L. A.; LEITE, F. P. L.; VAN DRUNEN DEN HURK, S. Bovine herpesvirus glycoprotein D: a review of its structural characteristics and applications in vaccinology. **Veterinary Research**, v.45, p.111-123, 2014.

DURAND, F. C.; DURAND, H. Probiotics in animal nutrition and health. **Beneficial Microbes**, V.1, n.1, p. 3-9, 2010.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.3-15, 1996.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization/ World Health Organization. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. London, Ontário, Canadá. 11p. April 30 and May 1, 2002. Disponível em <[www.who.int/foodsafety/fs\\_management/probiotic\\_guidelines.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/probiotic_guidelines.pdf)>. Acesso em 25 Nov. 2015.

FISCHER, G.; CONCEIÇÃO, F. R.; LEITE, F. P.; DUMMER, L. A.; VARGAS, G. D.; HÜBNER, S. O.; DELLAGOSTIN, O. A.; PAULINO, N.; PAULINO, A. S.; VIDOR, T. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**, v.25, p.1250-6, 2007.

FORSYTHE, P; BIENENSTOCK, J. Immunomodulation by commensal and probiotic bacteria. **Immunological Investigation**, v.39, n.4-5, p. 429-448, 2010.

GARSDIE, P.; INGULLI, E.; MERICA, R. R.; JOHNSON, J. G.; NOELLE, R. J.; JENKINS, M. K. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. **Science**, v.281, p.96-9, 1998.

GERAGHTY, R.; JOGGER, C.; SPEAR, P. Cellular expression of alphaherpesvirus gD interferes with entry of homologous and heterologous alphaherpesviruses by blocking access to a shared gD receptor. **Virology**, v. 268, p.147-58, 2000.

GERMAIN, R. N.; MILLER, M. J.; DUSTIN, M. L.; NUSSENZWEIG, M. C. Dynamic imaging of the immune system: progress, pitfalls and promise. **Nature Review Immunology**, v.6, n.7, p.497-507, 2006.

GIL DE LOS SANTOS, J. R.; STORCH, O. B.; GIL-TURNES, C. *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Saccharomyces boulardii* increased feed efficiency in broilers infected with *Salmonella enteritidis*. **British Poultry Science**, v.46, n.4, p. 494-497, 2005.

GIL-TURNES, C.; CONCEIÇÃO, F. R.; GIL DE LOS SANTOS, J. R. *Bacillus cereus* var. *toyoi* improves feed efficiency and health in animals. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, v.2, n.1, p.21-28, 2007.

GIL-TURNES, C.; SANTOS, A. F.; CRUZ, F. W.; MONTEIRO, A. V. Properties of the *Bacillus cereus* strain used in probiotic CenBiot. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.30, n.1, p.11-14, 1999.

GÓMEZ-LLORENTE, C.; MUÑOZ, S.; GIL, A. Role of Toll-like receptors in the development of immunotolerance mediated by probiotic. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.69, p.381–389, 2010.

GUARNER, F.; MALAGEADA, J. R. Gut flora and health and disease. **The Lancet**, v.361, n.9356, p.512-519, 2003.

HERICH, R.; LEVKUT, M. Lactic acid bacteria, probiotic and immune system, **Veterinarni Medicina**, v.47, p.169-180, 2002.

HOARAU, C.; LAGARAINÉ, C.; MARTIN, L.; VELGE-ROUSSEL, F.; LEBRANCHU, Y. Supernatant of *Bifidobacterium breve* induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.117, n.3, p.696-702, 2006.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. **Food Research International**, Amsterdam, v.35, n.2-3, p.109-116, 2002.

HONG, H. A.; DUC, L. H.; CUTTING, S. M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.813-835, 2005.

HUANG, J. M.; RAGIONE, R. M.; NUNEZ, A.; CUTTING, S. M. Immunostimulatory activity of *Bacillus* spores. **Federation of European Microbiological Societies. Immunology & Medical Microbiology**, v.53, p.195-203, 2008.

HUANG, J. M.; HONG, H. A.; TONG, H. V.; HOANG, T. H.; BRISSON, A.; CUTTING, S. M. Mucosal delivery of antigens using adsorption to bacterial spores. **Vaccine**, v.28, p.1021-1030, 2010.

IWASAKI, A. Mucosal dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v.25, p.381-418, 2007.

JIMÉNEZ, G.; URDIAIN, M.; CIFUENTES, A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; BLANCH, R. A.; TAMAMES, J.; KÄMPFER, P.; KOLSTØ, A. B.; RAMÓN, D.; MARTÍNEZ, J. F. CODOÑER, F. M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Description of *Bacillus toyonensis* s.p nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. **Systematic and Applied Microbiology**, v.36, p.383-391, 2013.

KANTAS, D.; PAPATSIROS, V. G.; TASSIS, P. D.; GIAVASIS, I.; BOUKI, P.; TZIKA, E. D. A feed additive containing *Bacillus toyonensis* (Toyocerin) protects against enteric pathogens in postweaning piglets. **Journal of Applied Microbiology**, v.118, p.727-738, 2015.

KAUFAMMAN, S. H. E. The contribution of immunology to the rational design of novel 23 antibacterial vaccines. **Nature**, v.5, p.491-504, 2007.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. **Immunity**, v.34, 2011.

KLASSE, P. J. Neutralization of Virus Infectivity by Antibodies: Old Problems in New Perspectives. **Advances in Biology**, v.2014, p.1-24, 2014.

KOENDERMAN, L.; BUURMAN, W.; DAHAC, M. R. The innate immune response. **Immunology Letters**, v.162, p.95-102, 2014.

- KREHBIEL, C. R.; RUST, S. P.; ZHANG, G.; GILLIAND, S. E. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. **Journal of Animal Science**, v.81, supplement .2, p.E120-E132, 2003.
- KRITAS, S. K; GOVARIS, A.; CHRISTODOULOPOULOS, G.; BURRIE, A. R. Effect of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* supplementation of ewe's feed on sheep milk production and young lamb mortality. **Journal of Veterinary Medicine**, v.53 , p.170–173, 2006.
- LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, C. J. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. **Nature Review Microbiology**, v.8, p.171–184, 2010.
- LEI, X.; PIAO, X.; RU, Y.; ZHANG, H.; PÉRON, P.; ZHANG, H. Effect of *Bacillus amyloliquefaciens*-based Direct-fed Microbial on Performance, Nutrient Utilization, Intestinal Morphology and Cecal Microflora in Broiler Chickens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.28, n.2, p.239-246, 2015.
- LI, H.; NOOKALA, S.; RE, F. Aluminum Hydroxide Adjuvants Activate Caspase-1 and Induce IL-1 and IL-18 Release. **The Journal of Immunology**, v.178, p.5271-5276, 2007.
- LI, Y.; XU, Q.; HUANG, Z.; LV, L.; LIU, X.; YIN, C.; YAN, H.; YUAN, J. Effect of *Bacillus subtilis* CGMCC 1.1086 on the growth performance and intestinal microbiota of broilers. **Journal of Applied Microbiology**, v.120, p.195-204, 2015.
- LITMAN, G. W.; RAST, J. P.; FUGMANN, S. D. The origins of vertebrate adaptive Immunity. **Nature Reviews. Immunology**, v.10, n8, p.543-53, 2010.
- LUTFUL KABIR, S. M. The Role of Probiotics in the Poultry Industry. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, p.3531-3546, 2009.
- MÁRA, M.; JULÁK, J.; MENCÍKOVÁ, E.; OCENÁSKOVÁ, J.; DOHNALOVÁ, A. Effect of crude bacterial lipids on the course of *Listeria* infection in mice. **Folia Microbiological**, v.37, n.6, p.455-60, 1992.
- MARTINS, L. H. R.; BERNE, M. E.; SILVA, P. E.; SCAINI, C. J. *Saccharomyces* MATSUZAKI, T.; CHIN, J. Modulating immune responses with probiotic bacteria. **Immunology and Cell Biology**, v.78, p.67-73, 2000.

MBOW, M.L.; DE GREGORIO, E.; VALIANTE, N.M.; RAPPUOLI, R. New adjuvants for human vaccines. **Current Opinion Immunology**, v.22, n.3, p.411-416, 2010.

MCFARLAND, L. V. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. **The American Journal of Gastroenterology**, v.101, p.812-822, 2006.

MCHEYZER-WILLIAMS, L. J.; MALHERBE, L. P.; MCHEYZER-WILLIAMS, M. G. Checkpoints in memory B-cell evolution. **Immunological Reviews**, v.211, n.1, p.255-268, 2006.

MLCKOVÁ, P.; CECHOVÁ, D.; CHALUPNÁ, P.; NOVOTNÁ, O.; PROKESOVÁ, L. Enhanced systemic and mucosal antibody responses to a model protein antigen after intranasal and intratracheal immunisation using *Bacillus firmus* as an adjuvant. **Immunology Letters**, v.77, n.1, p.39-45, 2001.

MONTGOMERY, R. I.; WARNER, M. S.; LUM, B. J.; SPEAR, P. G. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. **Cell**, v.87, p.427-36, 1996.

MONTOMOLI, E.; PICCIRELLA, S.; KHADANG, B.; MENNITTO, E.; CAMERINI, R.; DE ROSA, A. Current adjuvants and new perspectives in vaccine formulation. **Expert Review of Vaccines**, v.10, p.1053-1061, 2011.

MORI, A.; OLESZYCKA, E.; SHARP, F. A.; COLEMAN, M.; OZASA, Y.; SINGH, M.; O'HAGAN, D. T.; TAJBER, L.; CORRIGAN, O. I.; MCNEELA, E. A.; LAVELLE, E. C. The vaccine adjuvant alum inhibits IL-12 by promoting PI3 kinase signaling while chitosan does not inhibit IL-12 and enhances Th1 and Th17 responses. **European Journal of Immunology**, v.42, p.2709-2719, 2012.

MOWAT, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nature Reviews. Immunology**, v.3, n.4, p.331-41, 2003.

MURPHY, K. M.; REINER, S. L. The lineage decisions of helper T cells. **Nature Reviews. Immunology**, v.2, n.12, p.933-44, 2002.

NISS, J. H.; BRAND, S.; GU, X.; LANDSMAN, L.; JUNG, S.; MCCORMICK, B. A.; VYAS, J. M.; BOES, M.; PLOEGH, H. L.; FOX, J. G.; LITTMAN, D. R.; REINECKER, H. C. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. **Science**, v.307, n.5707, p.254-8, 2005.

OGAWA, T.; ASAI, Y.; TAMAI, R.; MAKIMURA, Y.; SAKAMOTO, H.; HASHIKAWA, S.; YASUDA, K. Natural killer cell activities of synbiotic *Lactobacillus casei* ssp. *casei* in conjunction with dextran. **Clinical Experimental Immunological**, v.143, n.1, p.103-109, 2006.

O'HAGAN, D. T.; VALIANTE, N. M. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. **Nature Reviews Drug Discovery**, p.727-735, 2003.

OUYANG, W.; KOLLS, J. K.; ZHENG, Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. **Immunity**, v.28, n.4, p.454-67, 2008.

ZANVIT, P.; HAVLÍČKOVÁ, M.; TÁČNER, J.; NOVOTNÁ, O.; JIRKOVSKÁ, M.; ČECHOVÁ, D.; JULÁK, J.; ŠTERZL, I.; PROKEŠOVÁ, L. Protective and cross-protective mucosal immunization of mice by influenza virus type A with bacterial adjuvant. **Immunology Letters**, v.115, n.2, p.144-152, 2008.

PASHINE, A.; VALIANTE, N. M.; ULMER, J. B. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. **Nature Medicine**, v.11, p.S63-8, 2005.

POZZONI, P.; RIVA, A. BELLATORRE, A. G.; AMIGONI, M.; REDAELLI, E.; RONCHETTI, TIRONI, A. R.; MOLTENI, E. E.; CONTE, D.; CASAZZA, G.; COLLI, A. *Saccharomyces boulardii* for the prevention of antibiotic-associated diarrhea in adult hospitalized patients: a single-center, randomized, doubleblind, placebo-controlled trial. **The American Journal of Gastroenterology**, v.107, p.922-931, 2012.

PROKESOVA, L.; MLCKOVA, P.; STANKOVA, I.; CHLOUBOVA, A.; NOVOTNA, V.; LADMANOVA, P.; CHALUPNA, P.; MARA, M. Adjuvant effect of *Bacillus firmus* on the expression of cytokines and toll-like receptors in mouse nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) after intranasal immunization with inactivated influenza virus type A. **Immunology Letters**, v.64, p.161-166, 1998.

PROKESOVÁ, L.; NOVÁKOVÁ, M.; JULÁK, J.; MÁRA, M. Effect of *Bacillus firmus* and Other Sporulating Aerobic Microorganisms on Stimulation of Human Lymphocytes. A Comparative Study. **Folia Microbiological**, v.39, n.6, p.501-504 1994.

REED, S.G.; BERTHOLET, S.; COLER, R.N; FRIEDE, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends in Immunology**, v.30, n.1, p.23–32, 2009.

RONCAROLO, M. G.; LEVINGS, M. K. The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. **Current Opinion in Immunology**, v.12, n.6, p.676-683, 2000.

ROOS, T. B.; DE LARA, A. P. S. S.; DUMMER, L. A. FISCHER, G.; LEITE, F. P. L. The immune modulation of *Bacillus cereus* var. Toyoi in mice immunized with experimental inactivated Bovine Herpesvirus Type 5 vaccine. **Vaccine**, v.30, p.2173-2177, 2012.

ROOS, T. B.; TABELÃO, V. C.; DUMMER, L. A.; SCHWEGLER, E.; GOULART, M. A.; MOURA, S. V.; CÔRREA, M. N.; LEITE, F. P. L.; GIL-TURNES, C. Effect of *Bacillus cereus* var. Toyoi and *Saccharomyces boulardii* on the immune response of sheep to vaccines. **Food Agricultural Immunology**, Basingstoke, v.21, n.2, p.113-118, 2010.

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, p.90, 2009. Disponível em <<http://veterinaria.ufpel.edu.br/posgrad/dissertacoes/TeseTalita.pdf>.> Acesso em 20 de novembro de 2014.

SANTILLO, A.; ANNICCHIARICO, G.; CAROPRESE, M.; MARINO, R.; SEVI, A.; ALBENZIO, M. Probiotics in milk replacer influence lamb immune function and meat quality. **The International Journal of Animal Biosciences**, v.6, n.2, p.339-345, 2012.

SCHAREK, L.; ATHERR, B. J.; TOLKE, C.; SCHIMIDT, M. F. B. Influence of the *Bacillus cereus* var. toyoi on the intestinal immunity of piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, p.136-147, 2007.

SCHIERACK, P.; FILTER, M.; SCHAREK, L.; TOELKE, C.; TARAS, D.; TEDIN, K.; HAVERSON, K.; LÜBKE-BECKER, A.; WIELER, L. H. Effects of *Bacillus cereus* var. toyoi on immune parameters of pregnant sows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, p.26-37, 2009.

SCHIERACK, P.; WIELER, L. H.; TARAS, D.; HERWIG, V.; TACHU, B.; HLINAK, A.; SCHMIDT, M. F. G.; SCHAREK, L. *Bacillus cereus* var. toyoi enhanced systemic immune response in piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.118, p.1–11, 2007.



SOLIMAN, A. H. S.; SHAROBA, A. M.; BAHLOL, H. E. M.; SOLIMAN, A. S.; RADI, O. M. M. Evaluation of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* for probiotic characteristics. **Middle East Journal of Applied Sciences**, v.05, n.01, p.10-18, 2015.

SOUZA, R. D.; BATISTA, M. T.; LUIZ, W. B.; CAVALCANTE, R. C. M.; AMORIM, J. H.; BIZERRA, R. S. P.; MARTINS, E. G.; FERREIRA, L. C. S. *Bacillus subtilis* Spores as Vaccine Adjuvants: Further Insights into the Mechanisms of Action. **PLoS ONE**, v.9, n.1, 2014

SPENCER, L. A.; WELLER, P. F. Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights. **Immunology and Cell Biology**, v.88, p.250-256, 2010.

STAMATI, S.; ALEXOPOULOS, C.; SIOCHU, A.; SAOULIDIS, K.; KYRIAKIS, S. C. Probiosis in sows by administration of *Bacillus toyoi* spores during late pregnancy and lactation: effect on their health status/performance and on litter characteristics. **Int J Probiotics Prebiotics**, v. 1, n. 33-40, 2006.

TANABE, S.; KINUTA, Y.; SAITO, Y. *Bifidobacterium infantis* suppresses proinflammatory interleukin-17 production in murine splenocytes and dextran sodium sulfate-induced intestinal inflammation, **International Journal Of Molecular Medicine**, v.22, p.181-185, 2008.

TARAS, D.; VAHJEN, W.; MACHA, M.; SIMON, O. Response of performance characteristics and fecal consistency to long-lasting supplementation with the probiotic strain *Bacillus cereus* var. *toyoi* to sows and piglets. **Archives of Animal Nutrition**, v.59, p.405-417, 2005.

THÉRY, C.; AMIGORENA, S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. **Current Opinion in Immunology**, v.13, n.1, p.45-51, 2001.

THOMAS, C. M.; VERSALOVIC, J. Probiotics-host communication: modulation of signaling pathways in the intestine. **Gut microbes**, v.1, n.3, p.148-163, 2010.

UYENO, Y.; SHIGEMORI, S; SHIMOSATO, T. Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity. **Microbes and environment**, v.30, n.2, p.126-132, 2015.

VILÀ, B.; FONTGIBELL, A.; BADIOLA, I.; ESTEVE-GARCIA, E.; JIMÉNEZ, G.; CASTILHO, M.; BRUFAU, J. Reduction of *Salmonella enterica* var. Enteritidis colonization and invasion by *Bacillus cereus* var. Toyoi inclusion in poultry feeds. **Poultry Science**, v.88, n.5, p.975-979, 2009.

VOGEL, F. S.; CARON, L.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E. R.; MAYER, S. V.; BASTOS, R. G. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.4512-4520, 2003.

WAN, Y. Y.; FLAVELL, R. A. How Diverse—CD4 Effector T Cells and their Functions. **Journal of Molecular Cell Biology**, v.1, n.1, p.20-36, 2009.

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

WYNN, S. G. Probiotics in veterinary practice. **Journal of the American Veterinary Medicine**, v.234, n.5, p.606-613, 2009.

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potencial as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnological Processes**, v.3, p.315-343, 1984.

ZANI, J. L.; CRUZ, F. W.; SANTOS, A. F.; GIL-TURNES, C. 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.

ZANVIT, P.; TICHOPÁD, A.; HAVLÍČKOVÁ, M.; NOVOTNÁ, O.; JIRKOVSKÁ, M.; KOLOŠTOVÁ, K.; CECHOVÁ, D.; JULÁK, J.; STERZL, I.; PROKEŠOVÁ, L. Adjuvant effect of *Bacillus firmus* on the expression of cytokines and toll-like receptors in mouse nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) after intranasal immunization with inactivated influenza virus type A. **Immunology Letters**, v.134, p.26-34, 2010.

ZIDEK, Z.; TUCKOVA, L.; MARA, M.; BAROT-CIORBARU, R.; PROKESOVA, L.; TLASKALOVA-HOGENOVA, H. Stimulation of macrophages by *Bacillus firmus*: production of nitric oxide and cytokines. **International Journal of Immunopharmacology**, v.20, p.359-368, 1998.

## **Anexos**

**Anexo A**  
**Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal**



Pelotas, 17 de junho de 2014

**De:** Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva  
*Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)*

**Para:** Professor Fábio Pereira Leivas Leite  
*Centro de Desenvolvimento Tecnológico*

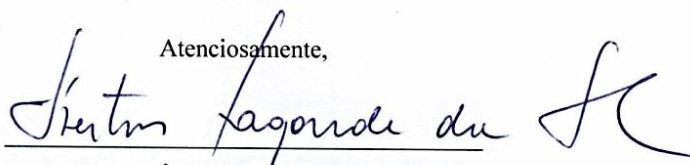
Senhor Professor:

A CEEA analisou o projeto intitulado: **“Avaliação do efeito imunomodulador de *Bacillus cereus* var. Toyoi em camundongos vacinados com a glicoproteína D recombinante de Herpesvírus bovinos tipo 5”**, processo nº23110.001981/2014-74, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer e assiná-lo, reenviar o processo à CEEA. Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 1981).

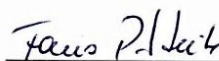
Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

  
**Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva**  
*Presidente da CEEA*

Ciente em: 02 / 07 /2014

Assinatura do Professor Responsável:

  
\_\_\_\_\_