

EFEITO IMUNOMODULADOR DE *Bacillus cereus* var. *Toyoi* EM CAMUNDONGOS VACINADOS COM VACINA RECOMBINANTE

FRANCISCO DENIS SOUZA SANTOS¹; ITAUÁ LESTON ARAUJO²; ALCEU GONÇALVES DOS SANTOS JUNIOR³; MICHELE DIAS HORNES ROSA⁴; LUCIANA FARIAS COSTA DE ÁVILA⁵; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁶

¹Programa de Pós-Graduação em Veterinária – UFPEL – denis.santos195@gmail.com

²Université Paris Diderot – France – itaualeston@gmail.com

³Programa de Pós-Graduação em Veterinária – alceugsjr@gmail.com

⁴Graduação em Biotecnologia – UFPEL – micha.hornes@gmail.com

⁵Programa de Pós-Graduação em Parasitologia – UFPEL – lucostaavila@hotmail.com

⁶Núcleo de Biotecnologia – UFPEL – fabio@leivasleite.com.br

1. INTRODUÇÃO

Vacinas de subunidade baseadas em antígenos recombinantes são menos reatogênicas, porém muitas vezes pouco imunogênicas assim vacinas de subunidades são geralmente administradas com adjuvantes para aumentar sua imunogenicidade (MBOW et al., 2010; REED et al., 2009). Neste contexto os probióticos assumem importância, pois modulam a resposta imune podendo ser considerados como possível alternativa para melhorar a eficácia de vacinas (ROOS et al., 2012, TOMASIK et al., 2003; SCHEZENMEIR & DE VRESE, 2001).

Probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). *B. Toyoi* exerce efeito imunomodulador sendo capaz de aprimorar a eficácia de vacinas em murínos, suínos e ovinos (SCHAREK, et al., 2007; ROOS et al., 2010).

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é o agente etiológico da meningoencefalite herpética dos bovinos. Vacinas de subunidade contra os herpesvírus são desenvolvidas baseadas nas principais glicoproteínas do envelope viral que são responsáveis pela ligação e penetração do vírus na célula e também medeiam as respostas imunológicas do hospedeiro a infecção (BABIUK et al., 1996). A glicoproteína D é essencial para penetração do vírus nas células hospedeiras (GERAGHTY et al., 2000).

Nosso grupo relatou a expressão da glicoproteína D de BoHV-5 na levedura *Pichia pastoris* e sua caracterização antigênica (Dummer et al., 2009). Neste trabalho utilizamos a glicoproteína D recombinante (rgD) de BoHV-5 como antígeno modelo para avaliar a modulação da resposta imune por *B. Toyoi* em camundongos vacinados com esta vacina recombinante.

2. METODOLOGIA

Os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPEL (Projeto número 1881). Foram utilizados 15 camundongos *Swiss*, fêmeas, de 28 dias de idade, divididos em três grupos denominados B.T alim, B.T s.c. e controle. Os animais foram alimentados com uma ração comercial isenta de quimioterápicos suplementada com 1×10^6 esporos viáveis de *B. Toyoi* gr⁻¹. O grupo B.T alim. recebeu uma ração comercial isenta de quimioterápicos suplementada com 1×10^6 esporos viáveis de *B. Toyoi* gr⁻¹. O grupo B.T s.c. recebeu a ração sem adição do probiótico e foi suplementado com 10^3 UFC/dose de *B. Toyoi* por via subcutânea (s.c)

simultaneamente à vacina. O grupo controle recebeu a mesma ração sem a adição do probiótico. Os animais de todos os grupos foram vacinados com rgD de BoHV-5, o adjuvante utilizado foi o hidróxido de alumínio. Foram administradas duas doses no intervalo de 21 dias, utilizando a via s.c. Amostras de sangue foram colhidas nos dias 0, 14, 21 e 28 do experimento e os soros foram centrifugados e separados, identificados individualmente e armazenados a -20°C até o momento de realização das análises. Os soros foram testados para IgG rgD específica total, IgG1 e IgG2a, através do ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto segundo Dummer et al. (2014). Os dados foram analisados usando o programa estatístico GraphPadPrism 11 v5.0d (GraphPad Software, CA, USA). As médias das absorbâncias dos soros dos animais de cada grupo, determinados a partir do ELISA, foram analisadas pelo teste two-way ANOVA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os camundongos dos grupos suplementados com *B. Toyoi* e do grupo controle apresentaram aumento nos níveis de anticorpos totais (IgG) em resposta a vacinação realizada no dia 0 e 21 do experimento. Todos os animais suplementados com o probiótico *B. Toyoi* apresentaram níveis de IgG superiores quando comparados ao grupo controle. O grupo B.T alim. no dia 21 do experimento apresentou níveis de IgG 1,5 vezes maiores ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle. No dia 28 este grupo apresentou níveis de IgG 2,7 vezes maiores ($p < 0,001$) quando comparados ao controle (Figura 1A). Os animais suplementados com 10^3 UFC/dose de *B. Toyoi* por via s.c simultaneamente à vacina, no dia 21 do experimento, mostraram níveis de IgG superiores, quando comparados ao grupo controle (2,1 vezes, $p < 0,001$), no dia 28 este grupo continuou demonstrando aumento nos níveis de IgG em relação ao grupo controle (2,6 vezes, $p < 0,001$) (Figura 1A).

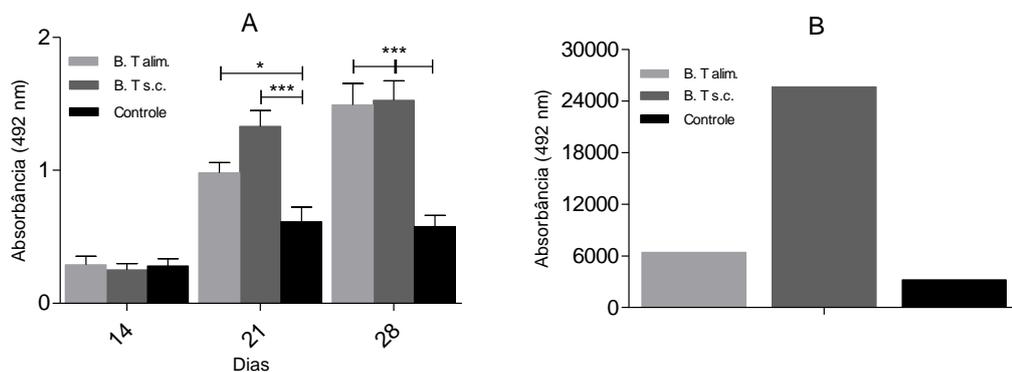


Figura 1. (A) Níveis totais de IgG no soro de camundongos vacinados com a rgD e suplementados com o probiótico *B. Toyoi*. Os dados representam as médias (\pm E.P.M) dos valores de ELISA das amostras de soro dos camundongos coletadas no dia 14, 21 e 28. . (B) Titulação dos níveis totais de IgG, os dados representam as médias (\pm E.P.M) dos valores de ELISA de pool de soros dos grupos no dia 28 do período experimental. Asteriscos (*) representam * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ diferença estatística teste two-way ANOVA.

Neste trabalho observamos o efeito modulador de *B. Toyoi* na resposta imune de camundongos vacinados com rgD de BoHV-5, através da

suplementação com o probiótico na alimentação e pela administração de 10^3 UFC/dose de *B. Toyoi* simultaneamente a vacina. Resultados similares foram observados em camundongos que receberam este probiótico na alimentação e foram vacinados com uma vacina inativada de BoHV-5 (ROOS et al, 2012). Em suínos a suplementação com *B. Toyoi* aumentou os títulos de anticorpos em leitões vacinados contra micoplasma e influenza, demonstrando que este probiótico estimula o aumento de populações celulares da imunidade sistêmica (SCHAREK, et al., 2007).

Na titulação dos soros realizada no dia 28 observou-se que o grupos suplementados apresentaram títulos maiores de IgG em relação ao controle. O grupo que recebeu a suplementação com *B. Toyoi* na alimentação (B.T alim.) apresentou títulos de IgG (1/6400) duas vezes maiores em relação ao controle (1/3200). Estes resultados reforçam a modulação da resposta imune humoral mediada pelo probiótico *B. Toyoi*. O grupo que foi suplementado com 10^3 UFC/dose (B.T s.c.) teve títulos (1/25600) oito vezes maiores quando comparado ao controle. Os altos títulos apresentados por este grupo demonstram a capacidade de *B. Toyoi* modular a resposta imune vacinal mesmo sendo administrado pela via s.c. (Figura 1B).

A modulação na resposta imune mediada pelo probiótico foi observada no perfil de isotipos de imunoglobulinas IgG1 e IgG2a. No dia 28 houve aumento nos níveis de IgG2a nos grupos suplementados com *B. Toyoi* em relação ao grupo controle, enquanto os níveis de IgG1 se mantiveram semelhantes. (Figura 2). Estes resultados sugerem uma tendência para o desenvolvimento de uma resposta de Th1. Esta observação é de grande importância no desenvolvimento da resposta imune vacinal, pois uma resposta imune Th1 é mais eficaz no controle de infecções causadas por vírus (PINTO et al., 2006).

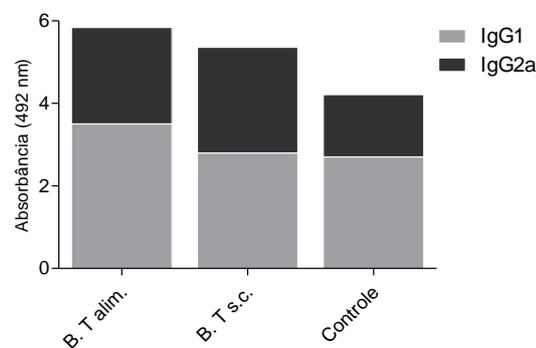


Figura 2. Perfil de isotipos de imunoglobulinas de camundongos vacinados com rgD e suplementados com o probiótico *B. Toyoi*. Os dados representam as absorbâncias a 492 nm demonstrados por ELISA indireto obtidas das amostras de soro em *pool* dos camundongos vacinados com a rgD e suplementados com o probiótico *B. Toyoi* e grupo controle. Níveis de IgG1 (barra cinza) e níveis de IgG2a (barra preta) no dia 28 do experimento.

4. CONCLUSÕES

O presente estudo indica que o probiótico *B. Toyoi* apresenta efeito imunomodulador em camundongos vacinados com a rgD de BoHV-5, constituindo-se numa alternativa para aumentar a eficácia de vacinas recombinantes. Os camundongos suplementados apresentaram níveis de IgG aumentados e mudança de perfil de isotipos de imunoglobulinas de IgG1 para

IgG2a, induzindo para uma resposta Th1. Nossos resultados sugerem que *B. Toyoi* tem potencial promissor como adjuvante de vacinas víricas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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**, 161, p.84-90, 2009.

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.

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. Acessado em 25 jun. 2014. Online. Disponível em www.who.int/foodsafety/fs_management/probiotics_guidelines.pdf.

GERAGHTY, R.J.; JOGGER, C.R.; SPEAR, P.G. Cellular expression of Alphaherpesvirus gD interferes with entry of homologous and heterologous Alphaherpesvirus by blocking access to a shared gD receptor. **Virology**, v. 268, p. 147-158, 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.

PINTO, R.A.; ARREDONDO, S.M.; BONO, M.R.; GAGGERO, A.A.; DÍAZ, P.V.T helper 1/T helper 2 cytokine imbalance in respiratory syncytial virus infection as associated with increased endogenous plasma cortisol. **Pediatrics**, v.117, p.878–886, 2006.

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.

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.

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.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p.361S-364S, 2001.

TOMASIK, P.J.; TOMASIK, P. Probiotics and Prebiotics. **Cereal Chemistry**, Madison, v.80, p.113-117, 2003.