

## **PROBIÓTICO *Bacillus toyonensis* MODULA A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES EM CAMUNDONGOS VACINADOS COM A GLICOPROTEÍNA D RECOMBINANTE DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5**

**PEDRO MACHADO MEDEIROS DE ALBUQUERQUE<sup>1</sup>; FRANCISCO DENIS SOUZA SANTOS<sup>2</sup>; VITÓRIA SEQUEIRA GONÇALVES<sup>2</sup>; RENAN EUGÊNIO ARAUJO PIRAINÉ<sup>2</sup>; RODRIGO CASQUERO CUNHA; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE<sup>3</sup>**

<sup>1,2</sup>Universidade Federal de Pelotas – albuquerque95pedro@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – fabio@leivasleite.com.br

### **1. INTRODUÇÃO**

Probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas são capazes de gerar diversos benefícios à saúde do hospedeiro (WHO/FAO, 2002). Suas atuações variam de acordo com a espécie de microrganismo, podendo exercer atividades desde a regulação do trato gastrointestinal, proteção contra patógenos e modulação da resposta imune (SAAD, 2006).

*Bacillus toyonensis* inicialmente foi identificado como *Bacillus cereus* var. toioy, é uma bactéria Gram-positiva capaz de esporular, que é utilizada como probiótico na alimentação animal (WILLIAMS et al., 2009). O probiótico *Bacillus toyonensis* possuem propriedades imunomoduladoras sendo capaz de aprimorar a eficácia de vacinas (ROOS et al., 2012).

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é o agente causador da meningoencefalite herpética, uma doença de importância econômica na pecuária, que acomete principalmente bovinos jovens. As vacinas recombinantes contra os herpesvírus são baseadas nas principais glicoproteínas do envelope viral. A glicoproteína D de herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é essencial para a ligação e penetração do vírus nas células permissivas, sendo um dos principais alvos da resposta imune do hospedeiro (DUMMER et al., 2014a).

A eficácia de uma vacina pode ser avaliada pelos níveis de anticorpos específicos no soro contra o antígeno após a vacinação. Esses níveis de anticorpos se correlacionam diretamente com a proteção e são descritos como referência para determinar a influência dos probióticos na resposta imune (MACDONALD & BELL, 2010).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do probiótico *Bacillus toyonensis* na resposta imune de camundongos vacinados com a glicoproteína D recombinante (rgD) de BoHV-5.

### **2. METODOLOGIA**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia, no núcleo Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da Universidade Federal de Pelotas (UFPeL). O probiótico foi produzido a partir de uma semente de *B. toyonensis* repicada em Ágar Sangue (8% sangue ovino) e incubada por 24h na temperatura de 37 °C. A partir deste cultivo sólido foram selecionadas colônias isoladas que foram inoculadas em frascos tipo Erlenmeyers de 500ml contendo 150mL de BHI (Brain Heart Infusion, Difco) por cerca de 18h na temperatura de 37 °C com agitação constante de 200rpm. Estes cultivos foram inoculados em 9L do meio NYSM em um Bioreator (Braun Biotech International

STATPLUS® B; Melsungen, Germany) com volume de entrada de ar mantido de 0.5 a 1.5 vvm e agitação de 300rpm por 96 horas. O cultivo foi centrifugado a 5000g durante 20min e concentrado em um volume final de 1L, colocado então em banho maria a 80 °C para eliminação das formas vegetativas. O controle de pureza foi realizado através da coloração de Gram e através da semeadura em Ágar Sangue.

Foram utilizados 20 camundongos *Swiss* divididos em dois grupos com dez animais em cada, denominados controle e probiótico. O grupo probiótico recebeu suplementação com  $1 \times 10^6$  esporos viáveis por grama de *B. toyonensis* adicionados na ração, enquanto o controle não foi suplementado. Ambos os grupos foram vacinados no dia 0 e 21 do experimento com a rgD de BoHV-5 adsorvida em 10% de hidróxido de alumínio. Amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 14, 28 e 42 do experimento e o soro separado e armazenado até o momento de realização das análises.

A presença de anticorpos neutralizantes contra BoHV-5 foi avaliada através da técnica de soroneutralização (FISCHER et al., 2007). Os títulos de anticorpos foram alculados pelo método de Behresn e Karben para determinação da diluição máxima capaz de neutralizar 100 CCID50% do vírus. Para avaliar a os níveis de IgG total, IgG1 e IgG2a foi utilizada a técnica de ELISA indireto (DUMMER et al., 2014b). A leitura foi realizada no leitor de microplacas a 492 nm.

Os esplenócitos dos camundongos foram cultivados e estimulados com a rgD e BoHV-5. Foi realizada a extração do RNA e a síntese de cDNA e em seguida, a técnica de PCR em tempo real para a avaliação da expressão relativa dos genes das citocinas IL-12, IL-4,  $\beta$ -actina e GAPDH. A análise estatística foi realizada utilizando os testes de variância (two-way ANOVA) e de análise de médias (Bonferroni posttest) através do software GraphPad Prism.

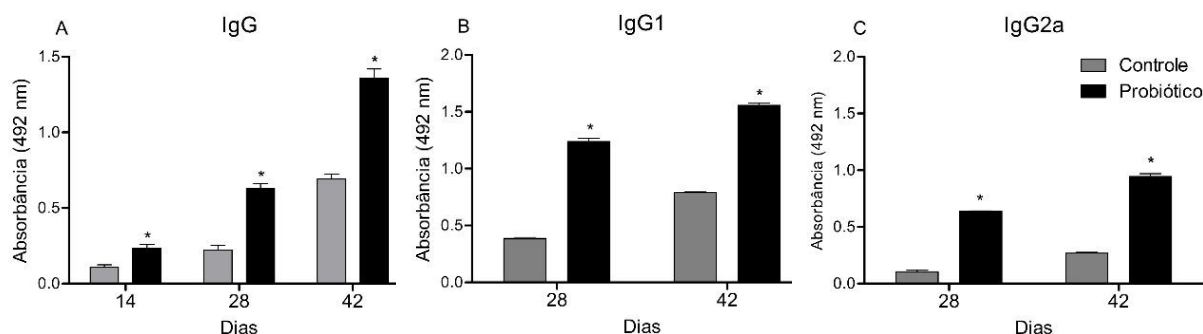
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os camundongos responderam a vacina com a produção de anticorpos. A suplementação com o probiótico *B. toyonensis* estimulou a produção de anticorpos neutralizantes contra o BoHV-5. No dia 28 e 42 do experimento foi observado que o grupo suplementado com o probiótico apresentou título de 16 e 32 respectivamente. Enquanto o grupo controle apresentou o título 4 no dia 28 mantendo o mesmo título no dia 42 (Tabela 1). Os anticorpos neutralizam o vírus bloqueando sua ligação aos receptores celulares impedindo a infecção de células permissivas. Após a vacinação contra um agente viral, anticorpos neutralizantes podem ser suficientes para proteção ou controle de infecções futuras (KLASSE, 2014). Como parâmetro comparativo, o Departamento dos de Agricultura dos Estados Unidos considera como imunizado um rebanho que tem 80% dos animais vacinados com título igual ou superior a 8 (USDA, 2005).

**Tabela 1.** Títulos de anticorpos neutralizantes em camundongos vacinados a rgD de BoHV-5 e suplementados com o probiótico *B. toyonensis*.

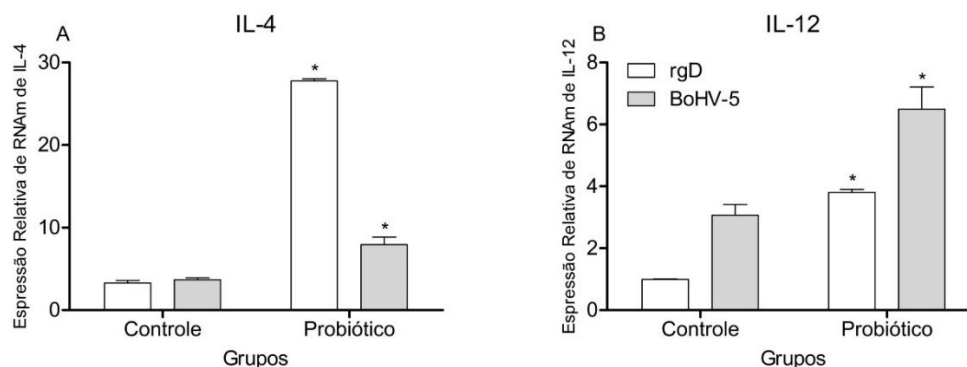
Grupos Experimentais	Títulos de anticorpos neutralizantes	
	Dia 28	Dia 42
Controle	4	4
Probiótico	16	32

Os camundongos suplementado com probiótico apresentaram níveis de IgG cerca de duas vezes maiores ( $p < 0,05$ ) em comparação ao grupo controle (Figura 1A). Também foram observados maiores níveis de IgG1 e IgG2a, diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) com relação ao grupo controle. (Figura 1B e 1C). A modulação na resposta imune humoral mediada por este probiótico foi observada em outras espécies animais como ovinos e suínos (ROOS et al., 2010; SHIERACK et al., 2007).



**Figura 1.** Dinâmica dos níveis de IgG em camundongos vacinados com a rgD de BoHV-5 e suplementados com *B. toyonensis*. (A) Níveis totais de IgG. (B) Níveis de IgG1. (C) Níveis de IgG2a. Os dados representam as médias ( $\pm$  erro padrão da média) dos valores de absorbâncias obtidas pelo ELISA indireto.

A suplementação com o probiótico *B. toyonensis* estimula a expressão das citocinas IL-4 e IL-12. A expressão gênica de IL-4 e IL-12 nos esplenócitos dos camundongos suplementados com o probiótico tiveram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle. Sendo que houve um aumento de 28 vezes na expressão de IL-4 e de 7 vezes na expressão de IL-12 (Figura 2A e 2B).



**Figura 2.** Expressão de RNAm das citocinas IL-4 e IL-12 em esplenócitos de camundongos vacinados com a rgD de BoHV-5 e suplementados com o probiótico *B. toyonensis*.

#### 4. CONCLUSÕES

O probiótico *B. toyonensis* modulou a resposta imune de camundongos vacinados com a rgD de BoHV-5. A suplementação com o probiótico estimulou a produção de anticorpos capazes de neutralizar as partículas virais. As propriedades imunomoduladoras de *B. toyonensis* abrem perspectivas para o estudo de seu potencial como adjuvantes de vacinas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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)>.

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.

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

MACDONALD, T.T.; BELL, I. Probiotics and the immune response to vaccines. **Proceedings of the Nutrition Society** v.69, 442-446, 2010.

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.

SAAD, S. M. Y. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.42, n.1, 2006.

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.

USDA. United States Department of Agriculture. **Animal and plant health inspection service**. USDA, 683-684, 2005. Disponível em: <http://tinyurl.com/yc6k9w9n>.

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