

EFEITO DO *Lactcaseibacillus casei* P054 NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE VACINAL

ILANA MAZZOLENI¹; VITÓRIA SEQUEIRA GONÇALVES²; FRANCISCO DENIS SOUZA SANTOS³; RENAN EUGÊNIO ARAUJO PIRAINÉ⁴; NEIDA LUCIA CONRAD⁵; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁶

¹Universidade Federal de Pelotas -ilana.mazzoleni@gmail.com;

²Universidade Federal de Pelotas – vitoriasgon@gmail.com;

³Universidade Federal de Pelotas – denis.santos195@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas- renanbiotec@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – conradneida@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com;

1. INTRODUÇÃO

Probióticos são organismos que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal, quando administrados em quantidade adequada (FAO/WHO, 2002). A resposta imune mediada por probióticos inclui a proliferação de células do sistema imune, aumento da produção de anticorpos, da atividade de fagócitos e da indução de citocinas (DE MORENO DE LEBLANC et al., 2008; SANTOS et al., 2018).

Bactérias ácido lácticas (BAL), como *Lactcaseibacillus casei*, apresentam propriedades imunológicas como indução de imunidade sistêmica e de mucosa, implicando em efeitos no sistema intestinal, como interações entre as bactérias e as células epiteliais e imunes (GALDEANO et al., 2006).

Em ensaios iniciais, foi descrita a necessidade de suplementação contínua para que os probióticos pudessem exercer todos os seus benefícios (DE MORENO DE LEBLANC et al., 2008). Entretanto, estudos recentes demonstram que apenas com 7 dias de uso, probióticos do gênero *Bacillus* conseguem estimular uma ação imunomoduladora em animais imunizados (SANTOS et al., 2018).

A vacinação é a medida mais promissora para o controle e prevenção de infecções por patógenos (KAUFMANN, 2007). Vacinas baseadas em antígenos recombinantes se mostram como uma alternativa segura, e com mínimas reações adversas, entretanto podem promover baixa resposta do sistema imune sendo necessário o uso de adjuvantes (MBOW et al., 2010). O uso de probióticos como suplementação junto à vacina pode ser uma alternativa para melhorar a imunogenicidade das vacinas recombinantes.

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5), causador da meningoencefalite herpética, apresenta grande importância veterinária, atingindo bovinos de todas as idades e na maioria das vezes sendo fatal, acarretando anualmente grande prejuízo econômico para a bovinocultura (VOGEL et al., 2003). Campos et al (2009) encontrou uma alta prevalência de infecção latente por herpesvírus bovino no estado do Rio Grande do Sul, no qual 41% dos animais testados apresentaram anticorpos neutralizantes contra BoHV-5.

A glicoproteína D é essencial para a penetração e fixação do BoHV-5 na célula hospedeira, sendo uma molécula alvo no desenvolvimento de novas vacinas (DUMMER et al., 2014). Em estudos anteriores, já foi demonstrado que a glicoproteína D de BoHV-5 recombinante (rgD) usada como antígeno vacinal, foi capaz de induzir altos níveis de anticorpos neutralizantes em camundongos e

bovinos (DUMMER et al., 2014; ARAUJO et al., 2018). Esta proteína foi selecionada como modelo experimental para avaliar a atividade probiótica do *L. casei* frente a animais imunizados.

O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade probiótica e imunomoduladora de *L. casei* em três períodos diferentes de suplementação em camundongos vacinados com a glicoproteína D de BoHV-5.

2. METODOLOGIA

L. casei foi semeado em meio MRS (de Man Rogosa & Sharpe) e incubado a 37 °C durante 24 h. Após o crescimento, foram selecionadas 3-5 colônias isoladas para o pré-inóculo em meio MRS líquido e incubadas em agitador orbital a 37°C por 24 h, então foram transferidas para frascos com 500 ml de meio MRS e incubadas sob as mesmas condições. A concentração de *L. casei* obtida nesses cultivos foi de aproximadamente 4×10^9 UFC/mL. O microrganismo foi adicionado na ração atingindo a concentração final de 1×10^6 UFC/g de ração administrada aos grupos experimentais.

Para avaliar a modulação da resposta imune foram utilizados camundongos da espécie Balb/c divididos em 5 grupos: 1) vacinados não suplementados; 2) suplementação contínua; 3) suplementação 72h pré imunização; 4) suplementação 48h pré imunização e 5) suplementação 24h pré imunização. Nos dias 0 e 21 os animais foram inoculados via subcutânea com 100 µl da vacina experimental formulada com 40 µg da glicoproteína D recombinante (rgD) de BoHV-5 adsorvida em 15% de hidróxido de alumínio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) como adjuvante. Amostras de sangue foram coletadas por punção submandibular em intervalos de 7 dias até o dia 42 do experimento. O manuseio dos animais e os procedimentos experimentais foram realizados seguindo as normas do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPEL (CEEA nº 28175).

A avaliação da resposta imune humoral foi verificada através de ensaio imunoenzimático (ELISA) conforme descrito por Dummer et al. (2014). A análise estatística foi realizada utilizando Prism version 7 (San Diego, CA, USA). Os valores das médias dos níveis de IgG obtidos pelo ELISA indireto foram submetidos à análise de variância (two-way ANOVA). As diferenças entre as médias foram analisadas pelo teste de Turkey, considerando-se que houve diferença significativa quando $p < 0.05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os camundongos dos grupos suplementados com *L. casei* e grupo controle responderam à vacinação com aumento dos níveis de IgG específicas totais contra BoHV-5. A partir do dia 14 os grupos suplementados nos períodos de 72 h e 48 h pré imunização apresentaram um aumento significativo ($p < 0.05$) nos níveis de IgG, sendo superior ao grupo que recebeu suplementação contínua e ao grupo não suplementado até o último dia experimental. O grupo suplementado por 24 h pré imunização, sete dias após a segunda dose atingiu níveis de IgG similares ($p < 0.05$) ao grupo de suplementação contínua, os quais se mantiveram até o último dia experimental (Figura 1).

Outros estudos relataram que o tratamento com *Lactobacillus* sp. por 28 dias após a administração da vacina viva atenuada contra Influenza aumentou as

taxas de proteção dos indivíduos contra o vírus (Davidson et al., 2011). Neste estudo evidenciamos que o *Lactobacillus casei* P054 promoveu um aumento na produção de IgG específico em camundongos imunizados contra BoHV-5. Todos os grupos que receberam suplementação com *L. casei* por diferentes períodos obtiveram níveis significativamente ($p < 0.05$) superiores de anticorpos, comparados com o grupo que não recebeu suplementação, demonstrando a modulação do sistema imune mediada pelo probiótico. Além disso, os resultados desse trabalho corroboram com o estudo de Santos (2018) demonstrando que a suplementação a curto prazo é capaz de promover a imunomodulação.

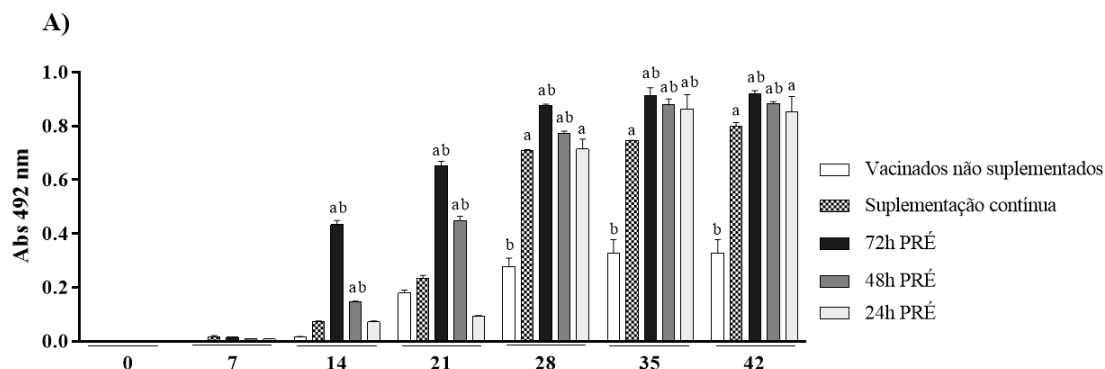


Figura 1. Dinâmica de IgG totais obtidos por ELISA indireto em camundongos vacinados com rgD5 de BoHV-5 e suplementados com *L. casei* previamente a imunização e controles ao decorrer dos dias experimentais. Letras distintas representam diferença estatística ($p < 0.05$)

4. CONCLUSÕES

É possível concluir que a suplementação com *L. casei* em camundongos vacinados com rgD5 contra BoHV-5 é capaz de modular a resposta imune. A suplementação realizada nos períodos de 72 e 48 horas previa as imunizações apresentaram aumento nos níveis de IgG sérica total a partir do dia 14, se mantendo até o final do experimento. Mais estudos serão realizados com o intuito de entender e avaliar os mecanismos de ação e o efeito imunomodulador de *L. casei* P054.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAUJO, I.L., DUMMER, L.A., RODRIGUES, P.R.C., DOS SANTOS, A.G., FISCHER, G., CUNHA, R.C. & LEITE, F.P.L. Immune responses in bovines to recombinant glycoprotein D of bovine herpesvirus type 5 as vaccine antigen. **Vaccine**.36(50).p. 7708–7714, 2018.
- CAMPOS, F. S. et al. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 139, n. 1-2, p. 67–73, 20 out. 2009.
- DAVIDSON, L.E., FIORINO, A.M., SNYDMAN, D.R. & HIBBERD, P.L. Lactobacillus GG as an immune adjuvant for live-attenuated influenza vaccine in healthy adults: A randomized double-blind placebo-controlled trial. **European Journal of Clinical Nutrition**.65(4).p. 501–507, 2011.

DUMMER, L.A., ARAUJO, I.L., FINGER, P.F., DOS SANTOS, A.G., DA ROSA, M.C., CONCEIÇÃO, F.R., FISCHER, G., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DENHURK, S. & LEITE, F.P.L. Immune responses of mice against recombinant bovine herpesvirus 5 glycoprotein D. **Vaccine**.32(21).p. 2413–2419, 2014.

FAO/WHO (2002).**Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. . p. 1–11

GALDEANO, C. M.; PERDIGÓNG.(2006). The Probiotic Bacterium *Lactobacillus casei* Induces Activation of the Gut Mucosal Immune System through Innate Immunity. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 2, p. 219–226, 2006.

KAUFMANN, S.H.E. The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines.**Nature Reviews Microbiology**.5(7).p. 491–504, 2007.

MBOW, M.L., DE GREGORIO, E., VALIANTE, N.M. & RAPPUOLI, R. New adjuvants for human vaccines. **Current Opinion in Immunology**.22(3).p. 411–416, 2010.

DE MORENO DE LEBLANC, A., CHAVES, S., CARMUEGA, E., WEILL, R., ANTÓINE, J. & PERDIGÓN, G. Effect of long-term continuous consumption of fermented milk containing probiotic bacteria on mucosal immunity and the activity of peritoneal macrophages. **Immunobiology**.213(2). p. 97–108, 2008

SANTOS, F. D. S. et al. *Bacillus toyonensis* improves immune response in the mice vaccinated with recombinant antigen of bovine herpesvirus type 5. **Beneficial Microbes**. v. 9, n. 1, p. 133-142, 2018

VOGEL, F. S. F. et al. Distribution of Bovine Herpesvirus Type 5 DNA in the Central Nervous Systems of Latently, Experimentally Infected Calves.**Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4512–4520, 2003.