

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 estudofoi avaliar a atividade probiótica e imunomoduladora de *L. casei* em três períodos diferentes de suplementação em camundongos vacinados com a glicoproteína D deBoHV-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 500ml 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 21os animais foram inoculados via subcutânea com 100 µl da vacina experimental formulada com 40 µg daglicoproteína D recombinante (rgD) de BoHV-5adsorvida 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 Dummeretal (2014).A análise estatística foi realizada utilizandoPrismversion7 (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 significante quando $p < 0.05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os camundongos dos grupos suplementados com *L. casei* e grupo controle responderam a 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 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 *Lacticaseibacillus 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.

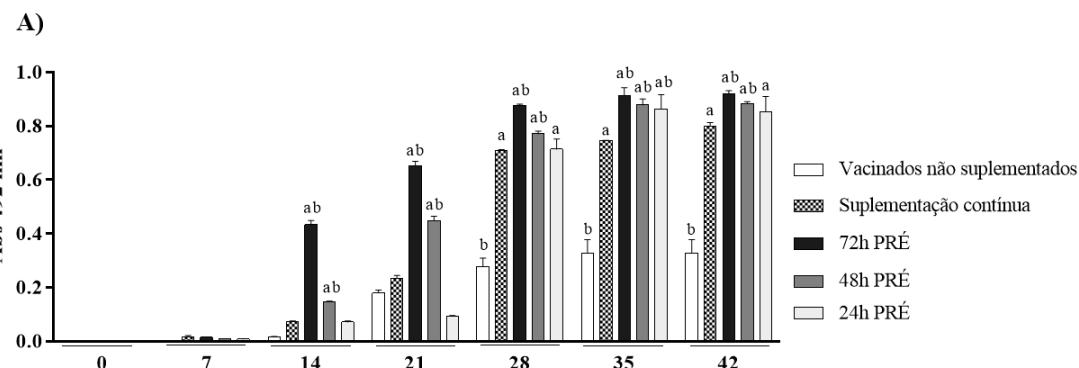


Figura 1. Dinâmica de IgG totais obtidos por ELISA indireto em camundongos vacinados com rgD5 de BoHV-5 e suplementados com *L. casei* previamente a imunização e controles ao decorrer dos dias experimentais. Letras distintas representam diferença estatística ($p<0.05$)

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 type5 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.; PERDIGÓN.(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. & RAPPOLI, 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.