

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

Efeito imunomodulador de *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Saccharomyces boulardii* em animais vacinados contra Herpesvírus Bovino tipo 5.

Talita Bandeira Roos

Pelotas, 2009.

TALITA BANDEIRA ROOS

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, sob orientação do Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Veterinária, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

Pelotas, 2009

Dados de catalogação na fonte:

(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

R781e Roos, Talita Bandeira

Efeito imunomodulador de *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Saccharomyces boulardii* em animais vacinados contra Herpesvírus Bovino tipo 5 / Talita bandeira Roos; orientador Fábio Pereira Leivas Leite. - Pelotas, 2009.- 89f. ; il..- Tese (Doutorado) –Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2009.

1. Probióticos 2. Imunomodulação 3. Vacinas I

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (orientador)

Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Franco (ICBS/UFRGS)

Prof^a. Dr^a. Sílvia Hübner (Faculdade de Veterinária/UFPel)

Prof. Dr. Geferson Fischer (Faculdade de Veterinária/UFPel)

Dr. João Rodrigo Gil de los Santos (Lifemed)

*Aos meus pais, Ari e
Rosa Maria, pelo amor*

*incondicional... por toda
minha vida.*

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, pela oportunidade da vida!

Aos meus pais, pelo amor, carinho, apoio e incentivo sempre.

Ao professor Fábio Leite, que foi mais do que orientador, foi mestre, foi amigo, exemplo de persistência e dedicação.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do IB e do Laboratório de Bacteriologia do CenBiot: pelo convívio, aprendizado profissional e pessoal.

A Rita, Marina, Marília, Adalgisa e Liana pela amizade, companheirismo e acima de tudo pelo ambiente de alegria sempre presente. Ao Régis, pela amizade, compreensão e incansável ajuda no experimento. À Luana, pela amizade construída, companheirismo e auxílio na realização desse trabalho.

Ao meu amigo, Tiago Gallina principalmente pela amizade e companheirismo de muitos anos, mas também pelo auxílio indispensável durante mais essa etapa.

À grande amiga Carina, que mesmo distante, sempre se fez presente com o coração em todos os momentos.

Ao Prof. Marcio Corrêa, em nome de toda equipe do NUPEEC, pela colaboração fundamental para realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade de realização deste curso de Pós-Graduação em Veterinária.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos os amigos não citados, mas que sabem que de alguma forma são fundamentais na minha vida.

Por fim, agradeço a todos que colaboraram de alguma forma na execução deste trabalho.

Muito Obrigada!

***"Cada dia que amanhece
assemelha-se a uma página
em branco, na qual gravamos
os nossos pensamentos,
ações e atitudes. Na
essência, cada dia é a
preparação de nosso próprio
amanhã."***

*Psicografia de Francisco C. Xavier
Livro Indicações do Caminho*

RESUMO

ROOS, Talita Bandeira. **Efeito imunomodulador de *Bacillus cereus* var Toyoi e *Saccharomyces boulardii* em animais vacinados contra Herpesvírus Bovino tipo 5.** 2009. 89f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. Orientador: Fábio Pereira Leivas Leite.

A imunização dos animais domésticos para controlar as doenças infecciosas, iniciada há mais de um século, tem despertado novo interesse em vista das restrições impostas pelos mercados consumidores ao uso de antibióticos e outros quimioterápicos. Vacinas mais eficientes e com menores efeitos colaterais foram desenvolvidas mediante a utilização de adjuvantes e antígenos purificados. Probióticos modulam a resposta imune, potencializando o efeito das vacinas, o que abre uma nova perspectiva de sua utilização. *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Saccharomyces boulardii* resistem às condições ambientais, o que facilita seu uso na elaboração, conservação e administração de rações para animais. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos imunomoduladores de *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Saccharomyces boulardii* na resposta imune em animais durante e após parar sua administração. Foram realizados dois experimentos, um com camundongos e outro em ovinos. Em cada experimento os animais foram divididos em três grupos, sendo um suplementado com *B. cereus* var. Toyoi, outro com *S. boulardii* e o terceiro sem suplementação grupo controle. Como modelo experimental foi utilizado uma vacina inativada contra BoHV-5. Foram utilizados, soroconversão e soroneutralização, para avaliação da resposta imune humoral e expressão de citocinas, de esplenócitos ou leucócitos periféricos, para avaliação da resposta celular. Todos os grupos mostraram aumento dos níveis de anticorpos em razão da vacinação. Os animais suplementados apresentaram níveis de anticorpos superiores, quando comparados ao grupo controle, durante a suplementação assim como após sua suspensão. Nos animais suplementados foi observada uma alteração no perfil da resposta imune de Th2 para Th1 este efeito observado através dos dados representados pelo perfil de citocinas, bem como pelo isotipo de IgG. Cada probiótico apresentou um perfil distinto de citocinas, sugerindo que a imunomodulação mediada por *B. cereus* var. Toyoi e *S. boulardii* possuem mecanismos distintos. Estes dados sugerem que a utilização de probióticos a base de *B. cereus* var. Toyoi e *S. boulardii* são eficientes moduladores da resposta vacinal, sendo uma alternativa viável a incrementar a eficiência de vacinas comerciais.

Palavras-chave: probióticos, imunomodulação, vacinas.

ABSTRACT

ROOS, Talita Bandeira. **Evaluation of the effects of *Bacillus cereus* var. Toyoi and *Saccharomyces boulardii* on the immune response of animals vaccinated against bovine type-5 herpesvirus (BoHV-5).** 2009. 90f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. Adviser: Fábio Pereira Leivas Leite..

The immunization of livestock as a means to control infectious diseases began more than a century ago. It has however aroused new interest in view of new demands by consumer markets, restricting the use of antibiotics and other chemotherapeutical drugs. In addition, more effective vaccines, with fewer side effects, have been developed through the use of adjuvants and purified antigens. Probiotics modulate the immune response, enhancing the effect of vaccines, which opens up a new perspective on their possible uses. *Bacillus cereus* var. Toyoi and *Saccharomyces boulardii* are resistant to environmental conditions, which facilitate their use in the production, conservation and management of animal feed. The objective of the present study was to evaluate the immunomodulatory effects of *Bacillus cereus* var. Toyoi and *Saccharomyces boulardii* on the immune response of animals both during and after the interruption of its administration. Two experiments were conducted, one with mice and the other with sheep. In each experiment, the animals were divided into three groups, one supplemented with *B. cereus* var. Toyoi, another with *S. boulardii* and the third was the control group, i.e., without supplementation. As experimental model we used an inactivated vaccine against BoHV-5. Seroconversion and neutralization were used to evaluate the humoral immune response and cytokine expression in splenocytes and peripheral leukocytes, so as to evaluate the cellular response. All of the groups showed increased levels of antibodies due to vaccination. The calves fed probiotics had higher antibody levels than the control group both during supplementation and after its suspension. In the supplemented animals a change was observed in the profile of the immune response in Th1 as compared to Th2. This effect was observed through the data represented by the cytokine profile, as well as through the IgG isotype. Each probiotic had a distinct profile of cytokines, suggesting that the *B. cereus* var. Toyoi and *S. boulardii* mediated immunomodulation have distinct mechanisms of action. These data suggest that the use of *B. cereus* var. Toyoi and *S. boulardii* probiotics are effective modulators of vaccine response, and are a viable alternative for increasing the efficiency of commercial vaccines.

Key-words: probiotic, immunomodulation, vaccine.

LISTA DE FIGURA

Metodologia Geral

Figura 1: Delineamento experimental em camundongos. Distribuição dos dias do experimento com camundongos.....30

Figura 2: Delineamento experimental em ovinos. Distribuição dos dias do experimento com ovinos.....30

Capítulo 1

Figura 1: Delineamento experimental em camundongos. Distribuição dos dias do experimento com camundongos.....40

Figura 2: Soroconversão dos animais imunizados com vacina contra BoHV-5.....42

Figura 3: Modulação na expressão de citocinas produzidas em esplenócitos estimulados *in vitro* com Concanavalina A (controle), DNA, Sobrenadante do cultivo e com a célula íntegra de *B. cereus* var. Toyoi.....44

Figura 4: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR amplificados a partir do cDNA de esplenócitos do camundongos estimulados *in vitro*45

Figura 5: Modulação na expressão de citocinas produzidas em esplenócitos de animais imunizados, suplementados com *B. cereus* var. Toyoi e estimulados com BoHV-5.....45

Figura 6: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR amplificados a partir do cDNA de esplenócitos do camundongos imunizados e suplementados com *B. cereus* var. Toyoi.....46

Capítulo 2

Figura 1: Delineamento experimental em camundongos. Distribuição do experimento em camundongos.....51

Figura 2: Soroconversão nos animais imunizados com vacina contra BoHV-5.....53

Figura 3: Modulação na expressão de citocinas produzidas em esplenócitos estimulados <i>in vitro</i> com Concanavalina A (controle), DNA, Sobrenadante do cultivo e com a célula íntegra de <i>S. boulardii</i>	55
Figura 4: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR amplificados a partir do cDNA de esplenócitos do camundongo estimulados <i>in vitro</i>	55
Figura 5: Modulação na expressão de citocinas produzidas em esplenócitos de animais imunizados, suplementados com <i>S. boulardii</i> e estimulados com BoHV-5.....	56
Figura 6: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR amplificados a partir do cDNA de esplenócitos do camundongo imunizados e suplementados com <i>S. boulardii</i>	56

Capítulo 3

Figura 1: Delineamento experimental em ovinos. Distribuição dos dias do experimento com ovinos.....	62
Figura 2: Soroconversão produzida nos animais imunizados com vacina contra BoHV-5.....	65
Figura 3: Título de anticorpos soroneutralizantes (log ₂) nos ovinos vacinados contra BoHV-5 e suplementados com <i>S. boulardii</i> , <i>B. cereus</i> var. Toyoi.....	66
Figura 4: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR amplificados a partir do cDNA de leucócitos periféricos de ovinos imunizados com BoHV-5.....	68
Figura 5: Modulação na expressão de citocinas produzidas em leucócitos periféricos estimulados com BoHV-5 nos dias 0, 28 e 63 do experimento, nos animais suplementados com <i>B. cereus</i> var. Toyoi, controle e suplementados com <i>S. boulardii</i>	69
Figura 6: Modulação na expressão de citocinas produzidas em esplenócitos estimulados com BoHV-5, no dia 63 do experimento. Animais suplementados com <i>B. cereus</i> var. Toyoi, controle e suplementados com <i>S. boulardii</i>	70

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1: Modulação da soroconversão produzida pela vacina contra BoHV-5 nos animais suplementados com *B. cereus* var. Toyoi.....43

Capítulo 2

Tabela 1: Modulação da soroconversão produzida pela vacina contra BoHV-5 nos animais suplementados com *S. boulardii*.....54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – Anticorpos

BoHV – Herpesvírus Bovino

CAA – Células apresentadoras de antígenos

CD – Células dendríticas

CEI – Células epiteliais intestinais

gD – Glicoproteína D

IFN- γ – Interferon

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

MHC – Complexo Principal de Histo-Compatibilidade

NK – Assassinas Naturais

OPD – Ortho-Phenylenediamine

TNF – Fator de necrose tumoral

UFC – Unidade formadora de colônia

min – Minutos

vvm - volume/volume de meio

L – litros

mL – mililitros

rpm – rotações por minuto

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL.....	16
HIPÓTESE.....	18
OBJETIVO GERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
1. Probióticos	19
2. Sistema Imune	21
3. Sistema Imune X Probióticos	24
4. Vacinas.....	26
5. Herpesvírus Bovino tipo 5 (BoHV-5).....	27
METODOLOGIA GERAL	29
1. <i>Produção do probiótico</i>	29
• Produção de <i>B. cereus</i> var. Toyoi.....	29
• Produção de <i>S. boulardii</i>	30
2. <i>Delineamento experimental</i>	30
3. <i>Suplementação dos animais</i>	32
4. <i>Vacina</i>	32
5. <i>Avaliação da resposta imune</i>	33
5.1 – Soroconversão.....	33
ELISA	33
Isotipagem.....	34
5.2 - Soroneutralização.....	34
5.3 - Avaliação de citocinas.....	35
6. <i>Análise estatística</i>	38
CAPÍTULO 1	39
Avaliação do efeito de <i>Bacillus cereus</i> var. Toyoi na modulação de camundongos vacinados contra Herpesvírus Bovino tipo-5.	39
1. Introdução	39
2. Metodologia Específica	40
2.1- <i>Probióticos</i>	40
2.2 – <i>Delineamento experimental</i>	40
2.3 – <i>Avaliação da resposta imune</i>	41
Soroconversão – ELISA	41
Soroconversão – Isotipagem.....	42
Indução de citocinas	42
3. Resultados	43
3.1 - <i>ELISA</i>	43
3.2 - <i>Isotipagem</i>	44
3.3 – <i>Indução de citocinas</i>	44
4. Discussão.....	47
CAPITULO 2.....	50

Modulação da resposta imune em camundongos vacinados contra Herpes

Vírus Bovino tipo-5 por <i>Saccharomyces boulardii</i>	50
1. Introdução	50
2. Metodologia específica	51
2.1- <i>Probióticos</i>	51
2.2 – <i>Delineamento experimental</i>	51
2.3 – <i>Avaliação da resposta imune</i>	52
Soroconversão – ELISA	52
Soroconversão – Isotipagem	52
Indução de citocinas	53
3. Resultados	53
3.1 – <i>ELISA</i>	53
3.2 - <i>Isotipagem</i>	54
3.3 – <i>Expressão de citocinas</i>	55
4. Discussão.....	57
CAPITULO 3.....	61
Avaliação do efeito dos probióticos <i>Saccharomyces boulardii</i> e <i>Bacillus cereus</i> var. Toyoi na resposta imune em ovinos	61
1. Introdução	61
2. Metodologia específica	62
2.1 – <i>Produção dos probióticos</i>	62
2.2 – <i>Delineamento experimental</i>	63
2.4 – <i>Avaliação da imunidade</i>	64
Soroconversão – ELISA	64
Soroneutralização	64
Expressão de citocinas	64
3. Resultados	65
3.1 - <i>ELISA</i>	65
3.2 - <i>Soroneutralização</i>	66
3.3 – <i>Expressão de citocinas</i>	67
4. Discussão	72
DISCUSSÃO GERAL	76
CONCLUSÃO GERAL	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

INTRODUÇÃO GERAL

A competitividade imposta pelo mercado globalizado fez com que os produtores e pesquisadores buscassem alternativas para intensificar os sistemas de produção. Uma destas possibilidades é a seleção genética, a fim de se obter animais com maior capacidade produtiva. Conseqüentemente, para atingir o máximo de produtividade, a suscetibilidade dos animais a doenças pode se tornar maior, sendo necessário um controle sanitário cada vez mais eficaz.

Uma alternativa utilizada para o controle sanitário é a adição de antimicrobianos em doses sub-terapêuticas à ração animal, os quais são utilizados tanto como promotores de crescimento quanto para controlar doenças infecciosas. Entretanto, a adição de antimicrobianos pode deixar resíduos nos produtos ou subprodutos de origem animal, além de induzirem o aumento de populações bacterianas resistentes. Assim alguns países têm restringido a entrada de produtos obtidos de animais nos quais se tenham utilizado antibióticos no processo de produção, existindo uma tendência mundial pela escolha de produtos com menores riscos à saúde.

A imunização através da vacinação é alternativa comprovadamente mais eficiente no controle sanitário. Desde a descoberta das primeiras vacinações realizadas por Jenner e Pasteur nos séculos XVIII e XIX, houve uma grande evolução no desenvolvimento de vacinas. Além daquelas consideradas tradicionais, compostas de patógenos vivos atenuados, organismos inteiros inativados ou de toxinas bacterianas inativadas, várias novas abordagens têm sido propostas. Assim, surgiram as vacinas de subunidades, vacinas recombinantes e vacinas de DNA.

Este recente progresso no desenvolvimento de vacinas tem permitido a sua utilização não apenas de modo profilático, mas também no tratamento do câncer, infecções crônicas e desordens imunológicas. Contudo, apesar do grande avanço tecnológico, muitas vacinas são pouco imunogênicas ou não conferem uma resposta imune capaz de prevenir a enfermidade. Uma alternativa possível para a melhoria destas vacinas é a modulação do sistema imunológico por outros meios, tais como o uso de probióticos.

A proibição da utilização dos antibióticos na alimentação animal, somado à necessidade de melhoria na resposta imune vacinal, aumenta a busca por alternativas aos antibióticos, utilizados tanto como promotores de crescimento como na prevenção de doenças. Uma opção que vem sendo estudada nas últimas décadas como possível substituinte aos promotores de crescimento, é a utilização de probióticos, que tem apresentado resultados promissores. Os probióticos têm sido utilizados na prevenção e no tratamento de doenças, na regulação da microbiota intestinal, no controle de distúrbios do metabolismo gastrointestinal, na inibição da carcinogênese, como promotores de crescimento e como imunomoduladores. Atualmente é reconhecido que os probióticos podem modular a resposta imune, potencializando a resposta as vacinas, o que abre uma nova perspectiva de sua utilização.

Pesquisas feitas na área de probióticos são direcionadas para avaliação da resposta imune de animais submetidos a dietas suplementadas com microrganismos probióticos. Os efeitos benéficos destes microrganismos probióticos têm sido observados na resposta imune inata, celular ou humoral. A capacidade dos probióticos em modular a resposta imune tem sido estudada, e são descritos efeitos como proliferação de leucócitos, produção de anticorpos, aumento da atividade fagocitária e indução da produção de citocinas.

A grande maioria dos trabalhos realizados nesta área utiliza espécies animais monogástricas, ressaltando a necessidade do estudo do efeito imunomodulador dos probióticos em ruminantes. Somado a este fato, a maioria dos estudos realizados nesta área tem utilizado lactobacilos ou bifidobactérias, que são microrganismos que apresentam restrições em sua administração na alimentação animal. O uso de microrganismos como, *Saccharomyces boulardii* e o *Bacillus cereus* var. Toyoi, que possuem uma maior resistência as condições ambientais são mais recomendados para utilização em sistemas de produção animal.

O presente projeto está registrado no COCEPE sob o número 5.05.00.004 e tem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS 0523299) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 474509/2004-4).

HIPÓTESE

Os probióticos *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Saccharomyces boulardii* possuem efeito modulador na resposta imune vacinal.

OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos imunomoduladores de *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Sacharomyces boulardii* na resposta imune vacinal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a resposta imune nos animais suplementados com probiotico.
2. Avaliar o perfil (Th1/Th2) da resposta imune nos animais suplementado com probióticos.
3. Avaliar a produção *in vitro* de citocinas produzidas por leucócitos estimulados com probióticos.
4. Avaliar a produção *ex vivo* de citocinas produzidas por leucócitos de animais imunizados suplementados com probióticos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Probióticos

Uma das mais promissoras áreas de desenvolvimento de alimentos funcionais tem sido o uso de probióticos e prebióticos devido a sua função relacionada diretamente com a saúde do hospedeiro (ERICKSON & HUBBARD, 2000). A imunização dos animais domésticos para controlar as doenças infecciosas, iniciada há mais de um século, tem despertado novo interesse em vista das restrições impostas pelos mercados consumidores ao uso de antibióticos e outros quimioterápicos, tanto para uso terapêutico, para a prevenção das doenças ou para incrementar a eficiência alimentar.

A alternativa mais promissora para substituição dos antibióticos são os probióticos, microrganismos que não deixam resíduos nos alimentos de origem animal e que são utilizados há décadas visando à substituição dos antibióticos (KREHBIEL et al., 2003; COPPOLA & GIL-TURNES, 2005). Como resultado, aumentou o interesse pelo estudo dos efeitos dos probióticos na saúde e produção animal (KREHBIEL et al., 2003), assim como o interesse na fabricação e utilização de vacinas mais eficientes (HONG et al., 2005).

O termo probiótico deriva do grego e significa “a favor da vida”, sendo o antônimo de antibiótico, que significa “contra a vida”, e ainda que ao longo dos anos o termo teve diferentes acepções, atualmente é utilizado para designar preparações ou produtos que contêm microrganismos viáveis definidos e em quantidade adequada, que alteram a microbiota própria das mucosas por implantação ou colonização de um sistema do hospedeiro, produzindo efeitos benéficos em sua saúde (SCHREZENMEIR & DE VRESE, 2001).

A maioria das informações sobre a influência dos probióticos até o momento foram obtidas com estudos baseados na utilização de lactobacilos ou bifidobactérias, bactérias utilizadas na alimentação humana e que são difíceis de armazenar e administrar para animais. *Bacillus cereus* var. *Toyoi* e *Saccharomyces boulardii*, pelo contrário, resistem às condições ambientais o que facilita seu uso na elaboração, conservação e administração de rações para animais (GIL-TURNES et al., 1999).

Apesar de que a maioria dos experimentos utilizando suplementação com probióticos apresentam resultados positivos, porém os mecanismos de ação envolvidos não estão bem elucidados. Inicialmente os microrganismos utilizados na alimentação animal foram espécies de *Lactobacillus* (STERN & STORRS, 1975), seguido por *Enterococcus*, *Pediococcus* e *Bacillus*, além de algumas espécies de leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *S. boulardii* (GUILLOT, 1998; THOMKE & ELWINGER, 1998).

Os trabalhos de validação de probióticos em ovinos são escassos, porém algumas pesquisas mostraram efeitos benéficos. Cordeiros suplementados com probióticos da primeira até a quinta semana de vida tiveram uma redução no índice de diarreia, diminuindo a contagem de microrganismos de 5,6 log₁₀ para 4,4 log₁₀ (LEMA et al., 2001) e um aumento no ganho de peso de em média 26,38% (BRASHEARS et al., 2003), enquanto o probiótico PIONEER PDFM® incrementou o ganho de peso diário em 3,65%, a ingestão de leite em 6,25% e a conversão alimentar melhorou em 2,34% (ANTUNOVIC et al., 2005). Ovinos suplementados com *Bacillus licheniformis* e *B. subtilis* apresentaram aumento de 130 mL da produção de leite e taxa de mortalidade 5,3% menor que cordeiros não suplementados (KRITAS et al., 2006).

TABELEÃO et al. (2006) comunicaram que as concentrações de glicose sanguínea, triacilglicerol e colesterol não foram diferentes ($p>0,05$) em cordeiros suplementados com *B. cereus* var. *toyoi*, *S. boulardii*, Monensina e nos controles. No entanto, as concentrações de uréia foram 26,64% maiores ($p<0,05$) nos ovinos suplementados com *B. cereus* var. *toyoi*, diferindo dos demais, exceto dos que receberam Monensina, concluindo que a utilização de probióticos na alimentação de ruminantes foi eficiente, visto que as alterações ruminais não foram expressivas e as metabólicas foram benéficas, além de não deixarem resíduos na carcaça.

Pesquisas realizadas em gado de leite com *Saccharomyces cerevisiae* demonstraram que a digestibilidade de proteína bruta e hemicelulose aumentaram em vacas não lactantes. No entanto, a digestibilidade da matéria seca e fibra detergente ácida permaneceu inalterada (WIEDMEIER et al., 1987). *Aspergillus oryzae* adicionado à ração aumentou a digestibilidade no rúmen e no trato digestivo total, não sendo afetadas a concentração de ácidos

graxos voláteis e amônia (GOMEZ-ALARCON et al., 1990), assim como a produção diária de leite (GOMEZ-ALARCON et al., 1991), resultados similares os de KELLEMS et al. (1990).

ROTH & KIRSCHGESSNER (1988) comprovaram que terneiros que receberam ração contendo *B. cereus* var. Toyoi na concentração de 1×10^9 esporos viáveis por kg aumentaram o ganho de peso em 3,9 % e melhorando a conversão alimentar em 3,2 %.

Alguns probióticos modulam a resposta imune, potencializando a resposta as vacinas, o que abre uma nova perspectiva de sua utilização (ÁVILA et al, 2000). Embora sejam escassas as pesquisas sobre o efeito de probióticos na imunidade de ruminantes, estes efeitos na imunidade de outras espécies são mais estudados, embora os processos envolvidos ainda não sejam bem esclarecidos, podendo envolver um ou vários componentes da resposta imune (ERICKSON & HUBBARD,2000).

2. Sistema Imune

A mucosa intestinal possui mecanismos capazes de degradar e repelir o material reconhecido como estranho ao hospedeiro. Além disso, a existência de um sistema imune altamente especializado auxilia na proteção da superfície mucosa, conseqüentemente, do restante do organismo contra possíveis agressões ambientais. O sistema imune de mucosas, ou MALT (mucosa-associated lymphoid tissues), contribui com cerca de 80% de todas as células imunes, formando o maior sistema linfóide dos mamíferos. O MALT, por estar presente em locais mais expostos a microrganismos, é o responsável pela principal proteção das mucosas à colonização de patógenos e impede a absorção de antígenos não degradados, diferenciando adequadamente qual o tipo de resposta que deve ser montada, além de regular a intensidade da resposta imune, evitando danos teciduais colaterais (CUMMINGS et al., 2004).

Os microrganismos comensais, assim como os probióticos, competem com os patogênicos, dificultando a colonização nas células intestinais. Os microrganismos que conseguem penetrar a camada epitelial, formada pelos enterócitos, são fagocitados. A penetração no intestino também pode acontecer através das células M, que estão presentes sobre as Placas de

Peyer e entre os enterócitos, formando uma camada epitelial. Estas células englobam moléculas presentes no lúmen intestinal, por fagocitose ou endocitose, transportando-as até a membrana basal e liberando-as para o espaço extracelular (transcitose) (CUMMINGS et al., 2004; MacDONALD & MONTELEONE, 2005).

A imunidade inata é um eficiente mecanismo de defesa contra microrganismos, sendo dessa forma capaz de controlar as infecções antes que a imunidade adquirida se torne eficaz. A imunidade inata consiste nas barreiras epiteliais, fagócitos, células Natural killer (NK), sistema complemento, citocinas e ainda outras proteínas plasmáticas próprias da imunidade inata. Os componentes da imunidade inata reconhecem estruturas comuns a diversas classes de microrganismos e que não estão presentes nas células do hospedeiro (McKENNA, et al., 2005).

A imunidade inata gera moléculas que funcionam como sinalizadores secundários que, junto com os antígenos, ativam os linfócitos B e T, respondendo através dos mecanismos humorais e celulares. Os mecanismos humorais agem através do bloqueio ou neutralização das moléculas agressivas que os agentes utilizam para invadir as células e tecidos do hospedeiro, dependendo para isso quase que exclusivamente de anticorpos específicos para epitopos dos antígenos. Outro mecanismo de destruição é a lise do agente, ou de células do agente pelo sistema complemento. Os mecanismos celulares promovem a fagocitose por leucócitos e a citotoxicidade mediada por células ou ainda por células e anticorpos. Cada mecanismo do sistema imune não atua isoladamente, um favorece o outro, e a interação dos mecanismos que vai gerar uma resposta efetiva (McNEELA & MILLS, 2001; MacDONALD & MONTELEONE, 2005).

Em resposta aos patógenos, células apresentadoras de antígeno e outras células do sistema imune secretam proteínas, chamadas de citocinas, que são intermediárias em muitas reações celulares da imunidade inata e acabam por influenciar as células Th0 para um tipo de resposta Th1, Th2, Threg ou Th17 (LARSSON et al., 1999). Os fatores que determinam se uma célula T CD4 em proliferação vai se diferenciar em Th1, Th2 ou Threg não são inteiramente conhecidos, porém as citocinas induzidas por agentes infecciosos (principalmente IFN- γ , IL-12 e IL-4) e os co-estimuladores usados para orientar

a resposta imune e a natureza do ligante MHC, possuem uma importância especial nessa diferenciação (BRADLEY, et al., 2000; O'GARRA & ARAI, 2000). As citocinas produzidas pelas células do sistema imune inato, não adaptativo, exercem fundamental papel nesse direcionamento da resposta imune adaptativa, uma vez que esta decisão de diferenciação ocorre no primeiro contato do antígeno com as células do sistema imune (BRADLEY, et al., 2000; O'GARRA & ARAI, 2000).

As conseqüências dessa decisão são de extrema importância na resposta adaptativa, a ativação seletiva de células Th1 induzem a uma resposta mais direcionada para proteção mediada por células, ao passo que a seleção de células Th2 proporcionam a imunidade humoral. As subpopulações mais bem descritas são denominadas células Th1 e células Th2. As células tipo Th1 secretam várias citocinas, entre elas IL-12, IFN- γ , TNF, enquanto as células tipo Th2 secretam IL-4, IL-5 entre outras citocinas.

Inicialmente os macrófagos e as células dendríticas respondem aos microrganismos com a produção da IL-12. A IL-12 em contato com as células apresentadoras de antígeno promovem a diferenciação das células T na subpopulação Th1. Essas células em seguida produzem IFN- γ . O IFN- γ é uma das mais importantes citocinas produzidas pelas células Th1 por ser um potente ativador de macrófagos, estimular a mudança de isotipos de anticorpos que promovem a fagocitose e amplificar a resposta das células T. O TNF também é uma citocina envolvida na imunidade inata e produzida pelas células tipo Th1, estão envolvidos principalmente no recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais da inflamação (MOSER & MURPHY, 2000; NAKAMURA, et al., 1997).

As células Th2 estimulam a imunidade independente de fagócitos, tanto IL-4 como a IL-10 pode inibir a proliferação de macrófagos e suprimir a imunidade mediada pelas células Th1, por essa razão a resposta imune mediada por células pode ser determinada pelo equilíbrio entre a ativação das células Th1 e Th2 (SEDER, et al., 1994).

As células Treg produzem IL-10 e TGF- β que bloqueia a ativação dos linfócitos e macrófagos, e inibe a produção de IL-12. As células regulatórias também podem interagir diretamente com os linfócitos ou células

apresentadoras de antígeno e suprimi-las por mecanismos indefinidos que não envolvem a produção de citocinas (LEVINGS & RONCAROLO, 2000).

IL-17 é uma citocina que inicia um importante papel no controle da resposta imune inata, é uma potente citocina inflamatória. A IL-17 é produzida por linfócitos $T\alpha\beta$, $T\gamma\delta$ e pelas células NK. Tem sido observada em grandes quantidades nas doenças que acometem o sistema imune (KAIKO et al., 2007).

Dessa forma observamos que o sistema imune não atua por um único mecanismo, ou por uma única via de estimulação, a imunidade inata age no primeiro momento ativando as células T e B, assim o sistema imune vai gerar respostas humorais e celulares. O sistema imune não atua isoladamente, cada mecanismo favorece o outro, e a interação destes é que vai gerar uma resposta eficiente (McNEELA & MILLS, 2001; MacDONALD & MONTELEONE, 2005).

3. Sistema Imune X Probióticos

HERICH & LEVKUT (2002) observaram que o efeito dos probióticos sobre a fagocitose é dependente do microrganismo utilizado. Por exemplo, a administração oral de *Lactobacillus casei* demonstrou proteção contra patógenos intestinais devido à estimulação da capacidade fagocítica dos macrófagos peritoniais e da atividade das enzimas envolvidas na fagocitose (PERDIGÓN & ALVAREZ, 1992), além da estimulação da atividade das células NK (KATO et al, 1984). A administração de bactérias ácido lácticas à camundongos produziu uma melhora na atividade de macrófagos peritoniais, pulmonares e leucócitos sanguíneos (de PETRINO et al., 1995), promovendo uma mais eficiente resposta inata.

MATSUZAKI (2000) demonstrou um aumento significativo da atividade das células NK do baço de camundongos alimentados com *Lactobacillus casei* cepa Shirota, confirmando que a administração deste probiótico melhora a resposta imune inata. Em camundongos suplementados oralmente com *L. casei* foi observado um aumento da atividade das células NK (HORI et al, 2003). Cepas de *L. casei* foram administradas oralmente a camundongos, os resultados sugerem que a bactéria isoladamente apresentou um aumento da

atividade das células NK, contribuindo para o aumento da atividade das células NK (OGAWA, et al., 2005).

Bifidobacterium infantis inibiu a produção de IL-17 e melhorou a produção de IL-27, quando as células foram estimuladas por TGF- β e IL-6. A indução de IL-10 também foi observada. Esses resultados sugerem a função imunomodulatória do probiótico que pode ser utilizado como auxiliar no tratamento de doenças mediadas pela resposta de células Th 17 (TANABE et al., 2008).

Leitões imunizados com vacina de *Escherichia coli* enterotoxigênica, suplementados com *Lactobacillus acidophilus*, apresentaram um maior título de anticorpos (ÁVILA et al., 1998). Camundongos suplementados com *Bifidobacterium breve* apresentaram aumento da produção de IgA anti-Rotavírus e de IgG antivírus contra Influenza, observando-se assim o estímulo do sistema imune por esse microrganismo (YASUI et al., 1999). Com a administração do mesmo microrganismo foi observado um aumento significativo da quantidade de IgA em resposta à infecção por *S. typhimurium* (PERDIGÓN et al., 1991). NICOLI & VIEIRA (2000) evidenciaram que camundongos suplementados com *L. acidophilus* ou *Saccharomyces boulardii* responderam com maior eficácia a uma septicemia provocada por *E. coli*, comparado com animais não suplementados. Ainda observaram que camundongos suplementados diariamente com *L. acidophilus* ou *S. boulardii*, mostraram-se mais resistentes a patógenos como *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae* e *Shigella flexneri*.

De Petrino (1995) observaram que camundongos suplementados com *Lactobacillus casei* apresentaram maior atividade fagocítica dos macrófagos, assim como das enzimas envolvidas na fagocitose (PERDIGÓN & ALVAREZ, 1992), além da maior atividade das células NK (KATO et al., 1984). MATSUZAKI (2000) evidenciou um aumento da atividade das células Natural Killer de camundongos suplementados com *L. casei* cepa Shirota, o que confirma que a administração deste probiótico melhora a resposta imune inata. Segundo HERICH & LEVKUT (2002) os efeitos dos probióticos sobre a resposta imune dependem do microrganismo utilizado, o que explica a diversidade de resultados observados com diferentes microrganismos.

Poucos trabalhos relatam estudos da influência de probióticos não pertencentes às bactérias ácido-lácticas na imunidade. COPPOLA et al. (2005) estudaram o efeito de *B. cereus* var. Toyoi e *S. boulardii* na resposta imune de camundongos vacinados com uma bacterina de *E. coli* e uma vacina replicante contra parvovírus canino. Esse autor relatou que, animais suplementados com *S. boulardii* obtiveram uma resposta humoral 1,8 vezes mais alta à bacterina, enquanto o *B. cereus* var. Toyoi induziu soroconversão 9,0 vezes superior à vacina de parvovírus canino.

Recentes estudos em nosso laboratório (ROOS et al., 2009) estudando o efeito dos probióticos a base de *S. boulardii* e *B. cereus* var. Toyoi em camundongos vacinados com antígeno viral e bacteriano, observaram que *S. boulardii* aumentou a resposta imune humoral a ambos antígenos, independente do adjuvante vacinal utilizado (hidróxido de alumínio ou óleo).

Resultados semelhantes observamos em ruminantes (ROOS et al., 2009) quando foi estudado o efeito de *B. cereus* var. Toyoi e *S. boulardii* adicionados à alimentação de ovinos vacinados contra Herpesvírus bovino tipo-5, comprovando que ambos grupos apresentaram médias de soroconversão significativamente maiores que as do grupo controle. Em ovinos vacinados com uma bacterina monovalente de *E. coli* as médias de soroconversão foram significativamente maiores para os grupos que receberam ração suplementada com *S. boulardii* e *B. cereus* var. Toyoi como probióticos. Esses dados demonstram que, assim como foi comprovado em animais monogástricos, ambos probióticos exerceram efeito imunomodulador também em poligástricos (ROOS et al. 2009). A partir das evidências relatadas observa-se o efeito modulador dos probióticos, porém se faz necessário uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no efeito na imunomodulação.

4. Vacinas

As primeiras vacinações realizadas por Jenner e Pasteur nos séculos XVIII e XIX eram práticas totalmente empíricas e se confundiram com o surgimento da própria imunologia como ciência (BAZIN, 2003). Desde então, houve uma grande evolução no desenvolvimento de vacinas. Além daquelas consideradas tradicionais, compostas de patógenos vivos, atenuados, de

organismos inteiros inativados ou de toxinas bacterianas inativadas, várias novas abordagens têm sido propostas. Assim, surgiram as vacinas de subunidades, vacinas recombinantes e vacinas de DNA.

Este recente progresso no desenvolvimento de vacinas tem permitido a sua utilização não apenas de modo profilático, mas também no tratamento do câncer, desordens imunológicas e infecções crônicas (BLOM & HILGERS, 2004). Contudo, apesar do grande avanço tecnológico, muitas vacinas são pouco imunogênicas ou não conferem uma resposta imune capaz de prevenir a enfermidade, necessitando da associação com substâncias que incrementem a resposta imune (SINGH & O'HAGAN, 2002).

Desta forma, o desenvolvimento de novas vacinas e o aperfeiçoamento de vacinas já existentes será beneficiado com a identificação de novas substâncias capazes de promover e direcionar a uma resposta imune apropriada (SINGH & O'HAGAN, 2002).

5. Herpesvírus Bovino tipo 5 (BoHV-5)

Descrito pela primeira vez em 1962 na Austrália (FRENCH, 1962), o BoHV-5 foi previamente classificado como uma variante neuropatogênica do BoHV-1 – BoHV1.3, vírus pertencente à subfamília Alphaherpesvirinae, gênero *Varicellovirus* (FRENCH, 1962). Tal classificação se deu pelas características morfológicas semelhantes e pelas reações cruzadas observadas entre as variantes BoHV1.1 (Rinotraqueíte) e BoHV1.2 (Vulvovaginite/Balanopostite) com o agente da neuropatia. No entanto, através de comparações subseqüentes de mapas de restrição do DNA viral (WHETSTONE, 1993), reatividade com anticorpos monoclonais e testes de neutralização cruzada (SOUZA et al., 2002) foi possível distinguir os dois vírus quanto ao genoma e propriedades antigênicas. Em 1992, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus propôs a classificação do BoHV-5 (ROIZMAN et al., 1992) e, em 2003, DELHON et al. elucidaram o genoma completo deste vírus, demonstrando a existência de 85% de identidade com o BoHV-1.

Infecções primárias pelo BoHV-5 ocorrem principalmente através das mucosas oculares e nasais, onde o vírus irá replicar-se por mais de 15 dias e ocasionar doença respiratória leve à moderada, além de eliminar ativamente

partículas virais através do muco secretado (DIEL et al., 2005). Neste estágio, os animais poderão recuperar-se da infecção, desenvolver uma infecção assintomática ou evoluir para doença neurológica fatal. A disseminação do vírus para os tecidos cerebrais ocorre pela invasão e replicação do vírus nas fibras nervosas cujas terminações distribuem-se na mucosa nasal e projetam-se para o bulbo olfatório, caracterizando a via olfatória como principal rota de acesso ao SNC, tanto em bovinos quanto em modelos animais infectados experimentalmente (DIEL et al., 2005). Outra rota de disseminação do vírus, a trigeminal, parece ter grande importância no estabelecimento da infecção latente, mas não no estabelecimento da doença durante a infecção primária aguda (DIEL et al., 2005).

O maior número de relatos de infecção por BoHV-5 ocorre em países onde não há programas de vacinação em larga escala e onde a prevalência de BoHV-1 é relativamente baixa (VOGEL et al., 2002). Apesar de numerosas vacinas vivas e inativadas terem sido desenvolvidas contra o BoHV-1 (JONES & CHOWDHURY, 2008), estas não impedem a formação de latência pelo BoHV-5 ou a transmissão viral (CASCIO et al., 1999). As vacinas inativadas, devido ao processo de inativação podem perder epítomos importantes resultando na geração de uma fraca imunidade protetora, e, portanto, necessitam de imunizações repetidas (CHOWDHURY; 2008).

Para a imunização ser eficiente deve-se considerar tanto a indução de imunidade humoral, a qual pode prevenir o estabelecimento da infecção, como a indução de respostas imunes celulares, importantes na recuperação de infecções pelos Herpesvírus e na redução da frequência e severidade das recrudescências (BABIUK & ROUSE, 1996).

METODOLOGIA GERAL

1. *Produção do probiótico*

Ambos probióticos foram produzidos no Laboratório de Bacteriologia, no Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DEMP), do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

Os microrganismos utilizados, *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Saccharomyces boulardii*, tiveram procedência do Laboratório de bacteriologia do Centro de Biotecnologia, UFPel, sendo gentilmente cedidas pelo Prof. Carlos Gil-Turnes.

Para seus cultivos foi utilizado um fermentador de bancada, produzido pela B. Braun Biotech International – BIOSTAB® - B, com capacidade para fermentar até 10 litros (L).

- Produção de *B. cereus* var. Toyoi

A semente da bactéria foi ressuspensa em solução salina estéril e semeada em ágar sangue, contendo 8% de sangue ovino, incubada por 24 horas à 37°C. Após o crescimento das colônias isoladas, foram inoculadas 3-5 colônias em cada Erlemeyers de 500 mL, contendo 150 mL de meio Infusão de cérebro e coração (BHI, Difco), previamente esterilizados. Estes foram incubados em agitador orbital (CERTOMAT® BS-T, B. Braun Biotech International), regulado para 200 rpm, 37 °C, permanecendo por 16 -18 horas (h), para que o inóculo estivesse em fase final exponencial de crescimento no momento da semeadura no fermentador. Foram inoculados 450 mL de inóculo no fermentador contendo o volume de 9 L de meio NYSM (YOUSTEN, 1984) líquido. As condições do processo de fermentação foram controladas, o fornecimento de ar foi mantido entre 0.5 a 1.5 L vvm para que durante o processo se obtivesse aproximadamente 80 % de oxigênio dissolvido no meio, bem como a agitação do cultivo variou de 100 a 300 rpm. A temperatura foi mantida em 37 °C durante 96 horas de cultivo, e sem ajuste de pH durante o processo.

Ao final das 96 h o cultivo foi centrifugado a 5000 x g por 20 minutos (min) em refrigeração e concentrado a um volume de 1 L. A suspensão final foi

aquecida em banho maria a 80 °C durante 15 min., para eliminar formas vegetativas do bacilo. A concentração de *B. cereus* obtida nestes experimentos foi de aproximadamente $2,0 \times 10^{10}$ UFC/mL. O controle de pureza foi realizado em todas as etapas por esfregaço utilizando a coloração de Gram e através de semeadura por esgotamento em meio de Ágar sangue.

- Produção de *S. boulardii*

A semente da levedura (liofilizada) foi ressuspensa em solução salina estéril e semeada em meio YPD (Levedura, Peptona e Dextrose) solidificado com ágar a 2%, incubada por 42 h à 28°C. Após o crescimento das colônias isoladas, foram inoculadas 3-5 colônias em cada Erlenmeyers de 500 mL, contendo 150 mL de meio YPD líquido, previamente esterilizados. Estes foram incubados em agitador orbital CERTOMAT® BS-T, da marca B. Braun Biotech International, regulado para 200 rpm, 28 °C, permanecendo por aproximadamente 24 h. Foram inoculados 450 mL de inóculo no fermentador contendo o volume de 9 L de meio YPD líquido. As condições do processo de fermentação foram controladas em aeração de 1L vvm durante o desenvolvimento do processo fermentativo desta forma mantendo aproximadamente 60% de oxigênio dissolvido. A agitação foi mantida em 200 rpm de forma a não causar dano celular e a temperatura de 28 °C durante 72 h.

Este material foi centrifugado a 4000 x g por 20 min. em refrigeração, suspenso em um volume de 1 L e mantido em refrigeração até sua utilização. Após centrifugação a suspensão era quantificada por contagem em placa, em média obtendo-se uma concentração de aproximadamente $2,0 \times 10^9$ UFC/mL.

O controle de pureza foi realizado em todas as etapas pela técnica de Gram e através de semeadura por esgotamento em ágar YPD e BHI incubados a 28 e 37 °C, respectivamente.

2. Delineamento experimental

Experimento em camundongos: No qual foram utilizados 30 camundongos Balb C isogênicos, fêmeas de 21 dias de idade. Os animais tiveram procedência do biotério da UFPel. O delineamento do experimento está representado na figura 1.

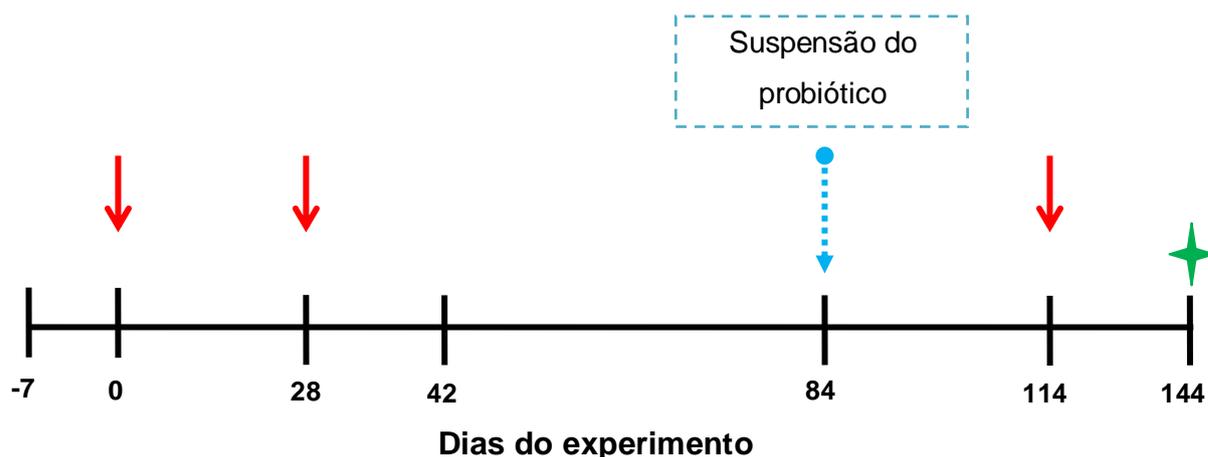


Figura 1: Delineamento experimental em camundongos, distribuição dos dias do experimento com camundongos. Sete dias antes da primeira dose da vacina os animais foram adaptados a respectiva ração. A seta vermelha indica os dias de vacina, seta azul a suspensão do probiótico, estrela verde indica o dia do cultivo dos esplenócitos. Nos dias 0, 28, 42, 114 e 144 foi coletado sangue para obtenção do soro.

Experimento em ovinos: Foram utilizados 30 ovinos, fêmeas de 5 meses de idade (cruzamento Corriedale com Ideal). O delineamento do experimento está representado na figura 2.

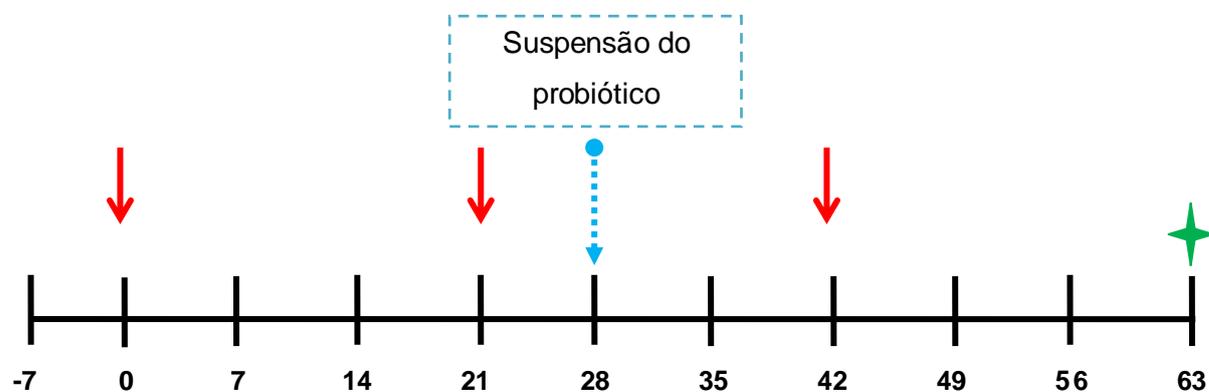


Figura 2: Delineamento experimental em ovinos, distribuição dos dias do experimento com ovinos. Sete dias antes da primeira dose da vacina os animais foram adaptados aos probióticos. A seta vermelha indica os dias de vacina, seta azul a suspensão do probiótico, estrela verde indica o dia do cultivo dos esplenócitos. Nos dias 0, 28 e 63 foi coletado sangue para cultivo dos leucócitos periféricos, nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 42, 56 e 63 foi coletado sangue para obtenção de soro.

3. Suplementação dos animais

No experimento em camundongos, o probiótico foi adicionado à ração dos animais. Foi utilizada ração comercial isenta de quimioterápicos (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes S.A., PR, Brasil). A ração foi previamente triturada e após adicionado os probióticos no Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DEMP), do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

Foi preparada uma formulação contendo amido de milho a 8% com ração comercial triturada, a esta foram adicionados os probióticos *S. boulardii* (1×10^7 UFC gr^{-1}) ou *B. cereus* var. Toyoi (1×10^6 esporos viáveis de gr^{-1}) de ração, respectivamente. Essas formulações foram peletizadas e mantidas em estufa com circulação de ar forçada, permanecendo por 18 horas à temperatura de 40°C. Após a ração foi armazenada em refrigeração até sua administração.

A estimativa da concentração dos probióticos na ração foi realizada a cada 15 dias para assegurar a manutenção da concentração dos mesmos na ração fornecida aos animais.

No experimento em ovinos, foi fornecida a suspensão do probiótico por via oral a cada animal. Todos os animais foram alimentados com 2% do seu peso vivo/dia, de ração isenta de quimioterápicos. Os animais dos grupos suplementados receberam 1×10^7 UFC de *S. boulardii* gr^{-1} ou 1×10^6 esporos viáveis de *B. cereus* var. Toyoi gr^{-1} de ração. A suspensão dos probióticos foi mantida em refrigeração e a estimativa da concentração dos probióticos na suspensão foi realizada a cada sete dias para assegurar a presença da concentração dos mesmos na suspensão fornecida aos animais.

4. Vacina

As vacinas foram preparadas utilizando como antígeno uma amostra de Herpesvírus bovino tipo-5 (BoHV-5), isolado no Laboratório de Virologia e Imunologia da UFPel, cultivado em cultura de células MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney). Foi utilizada uma concentração de 1×10^6 dose infectante em

cultura de tecido (DICT₅₀) mL e inativados por bromoetilamina – BEI (C2H7Br2N - Merck), 20 mM, pH 7.5.

No experimento realizado com camundongos foi utilizada uma formulação utilizando 15% de hidróxido de alumínio, enquanto nos ovinos foi utilizada uma formulação oleosa (50% antígeno 50% óleo, Montanide).

5. Avaliação da resposta imune

5.1 – Soroconversão

ELISA

Os anticorpos totais foram avaliados por ELISA, utilizando-se placas de poliestireno com 96 cavidades. Seguiram-se protocolos padrões (CROWTHER, 2001) para a realização do teste. Para sensibilização da placa utilizou-se 50 µL de suspensão contendo 2 µg/mL de glicoproteína D recombinante de BoHV-5 diluída em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 (DUMMER et al. 2007), permanecendo por 18 horas a 4°C. Após foram lavadas três vezes com tampão fosfato pH 7,6 contendo Tween 20 a 0,5 % (PBS-T) pH 7,6. Os soros foram diluídos (1/100 soro de cada camundongo ou 1/40 de ovinos) em PBS-T, adicionado 50 µl de cada diluição por cavidade (em duplicata) e incubadas por 90 minutos a 37°C, em seguida novamente lavadas três vezes com PBS-T e após o adicionado 50 µl do conjugado (diluído 1/2000 em PBS-T de imunoglobulina de coelho anti-camundongo DAKOPATTS A/S, Dinamarca, ou 1/2000 de imunoglobulina de coelho anti-ovina DAKOPATTS A/S, Dinamarca, as duas imunoglobulinas conjugadas com peroxidase) e incubadas por 90 minutos a 37°C. Em seguida as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T e logo depois foi adicionado 50 µl de substrato/cromógeno Ortho-Phenylenediamine (OPD, Sigma), deixando reagir por 15 minutos no escuro, a temperatura ambiente. As absorbâncias foram medidas em um leitor de microplacas (MR 700 Microplate Reader, Dynatech Laboratories, Alemanha) a 450 nm. As absorbâncias de cada amostra foram divididas pela absorbância do soro da coleta 1(dia zero) do mesmo animal, e os resultados expressos como soroconversão.

Isotipagem

Para avaliação das IgG1 e IgG2a foi utilizado um *kit* de isotipagem (Sigma A 9044), foram realizados *pool* dos soros, sendo utilizado um *pool* de cada grupo por coleta.

Seguiram-se os protocolos padrões para a realização do teste. Para sensibilização da placa utilizou-se uma suspensão contendo 2 µg/mL de glicoproteína D recombinante de BoHV-5 diluída em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 (DUMMER et al. 2007). A placa foi sensibilizada por 60 minutos a 37°C. A placa foi lavada três vezes com PBS-T, após foram adicionados 50µL de cada *pool* de soro diluído 1/200 em PBS-T (em duplicata), a placa foi incubada 90 minutos a 37°C. Novamente lavada três vezes com PBS-T e adicionado 50µL do anti-isotipo diluído na proporção de 1/10000 em tampão fosfato pH 7,6 (PBS) mantida em incubação por 120 minutos a 37°C. Lavadas três vezes com PBS-T e adicionado 50µL de imunoglobulina de cabra anti-camundongo conjugada com peroxidase (DAKOPATTS A/S, Dinamarca, Peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins) diluído na proporção de 1/5000 em PBS-T, incubadas por 15 minutos a 37°C. Após as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T e em seguida adicionado 50 µl de substrato/cromógeno (OPD), deixando reagir por 15 minutos no escuro, a temperatura ambiente. As absorbâncias foram medidas em um leitor de microplacas (MR 700 Microplate Reader, Dynatech Laboratories, Alemanha) a 450 nm. As absorbâncias de cada amostra foram divididas pela absorbância do soro da coleta 1 do mesmo *pool*, e os resultados expressos como soroconversão.

5.2 - Soroneutralização

Para titulação dos anticorpos neutralizantes contra BoHV-5, amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 14, 42 e 63. Após a coleta o sangue foi processado e o soro armazenado a -20°C. Um *pool* dos soros de cada grupo foi realizado. Os anticorpos foram titulados pela técnica de soro neutralização. Cada *pool* foi diluído de 1:2 até 1:256, 25 µl foram distribuídos em quadriplicata em placas de poliestireno. Após a distribuição do soro diluído, foram adicionados 25 µl de suspensão do vírus contendo 100 DICT₅₀ as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C em ambiente com 5% de CO₂. Após

aproximadamente 3×10^4 células foram adicionadas em cada orifício. As microplacas foram novamente incubadas durante 2 dias, quando observadas no microscópio invertido e 100 DICT₅₀ das células controle tinham apresentado o efeito citopático. A ausência de efeito citopático indica que houve a neutralização do vírus, enquanto a presença do efeito citopático é resultado da ausência de anticorpos neutralizantes. O título dos anticorpos foram calculados pelo método de Behrens & Kärber (MAYR et al., 1982).

5.3 - Avaliação de citocinas

A avaliação da imunidade celular foi realizada nos dois experimentos, em camundongos foi realizada a partir de um *pool* dos baços de animais de cada grupo, ao final do experimento. Nos ovinos foi realizado o cultivo de leucócitos a partir de coletas de sangue periférico durante o período experimental, sendo o baço coletado e os esplenócitos cultivados, no final do período experimental.

No experimento em camundongos, três animais de cada grupo no dia 144 foram eutanaziados, os baços removidos assepticamente, macerados e as células foram suspensas em solução balanceada de HANK'S (sem Ca e Mg) (Cultilab, Campinas, Brasil). Após as células foram centrifugadas a 2200 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em soluções de lise (cloreto de amônia a 0,8%) por 5 min a temperatura ambiente, para lisar as hemácias. A suspensão foi centrifugada a 2200 x g por 10 min e o sobrenadante descartado, as células foram suspensas em solução balanceada de HANK'S (Cultilab, Campinas, Brasil) para lavagem das células, novamente centrifugadas e novamente suspensas em RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, Brasil) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil). Foram semeadas em uma concentração de 2×10^4 células viáveis por cavidade em placas de cultivo celular de 24 cavidades (TPP, Techno Plastic Products) e incubadas por 24 horas em uma atmosfera de 5% CO₂ a 37°C. Após foram retirados os sobrenadantes dos cultivos e as células foram estimuladas adicionando 200 µL de suspensão contendo 10^5 DICT₅₀ mL⁻¹ de BoHV-5 mais 800 µL de meio RPMI 1640 com 5% de SFB. Após 24 horas o sobrenadante foi novamente retirado e as células foram retiradas em Trizol e armazenadas a -70°C.

No experimento em ovinos, foi realizado cultivo de esplenócitos e de leucócitos periféricos. Os leucócitos periféricos foram cultivados nos dias 0, 14, 28 e 63 do experimento. Foram coletados 15 mL de sangue por animal, em tubo estéril contendo 10% de citrato de sódio a 4% (anticoagulante), o sangue foi centrifugado a 2200 x g por 20 min. a temperatura ambiente para separação das células. Os leucócitos foram retirados e transferidos para outro tubo estéril e ressuspensos em solução de lise celular por 5 min. a temperatura ambiente, essa etapa foi realizada por até 2 vezes. A suspensão foi centrifugada a 2200 x g por 10 min. e o sobrenadante descartado, as células foram novamente suspensas em HANK'S para lavagem das células, centrifugadas e ressuspensas em RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil). Foram cultivadas 2×10^4 células viáveis por cavidade em placas de cultivo celular de 24 cavidades (TPP, Techno Plastic Products) e incubadas por 24 horas em 5% CO₂ a 37°C. Após as células foram estimuladas adicionando 300 µL de suspensão de BoHV-5 (1 M.O.I.). Após 24 horas as células foram coletadas em Trizol e armazenadas a -70°C.

Posteriormente o RNA total foi extraído pelo método do TRIZOL (Invitrogen) de acordo com o protocolo do produto. A síntese de cDNA foi realizada a partir de 5 µg de RNA total em uma reação de 25 µl contendo 0,5 µl (150 ng) de *random primers* (Invitrogen), 1 µl de *desoxynucleoside triphosphates* (dNTP - 10 mM), 1 x *First Strand buffer* (New England Biolabs), 0,1 M DDT, 40 U of RNaseOUT (Invitrogen) e 50 U of M-MuLV Retrógrado Transcriptase (New England Biolabs), de acordo com a metodologia descrita (ULET et al., 2000). Após as amostras foram incubadas por 10 min a 25 °C, 50 minutos a 42°C, 15 minutos a 70°C, no termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient). O cDNA resultante foi estocado a -20°C.

Para camundongos as reações de PCR foram realizadas com 2 µl de cDNA, 200 µM de dNTPs, 1 x *buffer*, 1,5 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen), 1 µM de cada primer, 3 mM MgCl₂ para IFN-γ ou 1,5 mM para β-actina, 2 mM MgCl₂ para IL-10 e IL-12, RNase free water (Gibco-BRL) para um volume final de 25 µl. Os parâmetros do termociclador foram os seguintes: 95 °C por 2 minutos, 30 Ciclos de 94 °C por 50 segundos, 60 °C por 50 segundos e 72 °C por 1 minuto, com uma temperatura final de extensão de 72 °C por 7 minutos. Os oligômeros iniciadores utilizados no experimento com

camundongos foram descritos na literatura (ULETT et al., 2000) e sintetizados por MWG-Biotech Inc. (USA), foram eles:

β -actin anterógrado 5'-TGG AATCCTGTGGCATCCATGAAAC;

β -actin retrógrado 5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG.

IFN- γ anterógrado 5'-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG;

IFN- γ retrógrado 5'-GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG;

IL-10 anterógrado 5'-ACC TGG TAG AAG TGA TGC CCC AGG CA;

IL-10 retrógrado 5'-CTA TGC AGT TGA TGA AGA TGT CAA A;

IL-12p40 anterógrado - GAG GTG GAC TGG ACT CCC GA;

IL-12p40 retrógrado - CAA GTT CTT GGG CGG GTC TG;

Reações de PCR utilizando oligômero iniciador de β -actina e sem cDNA foram realizadas como controle. Produtos do PCR foram visualizados sobre luz UV após eletroforese em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio. A análise dos dados foi realizada utilizando Scientific Imaging System software (Kodak).

Em ovinos reações de PCR foram realizadas com 3 μ l de cDNA, 200 μ M de dNTPs, 1 \times *buffer*, 1,5 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen), 1 μ M de cada primer, MgCl₂ (2 mM para GPDH, IL-17, TNF, IL-4 e IL-10 ou 1,5 mM para IFN- γ), RNase free water (Gibco-BRL) para um volume final de 50 μ l. Os parâmetros do termociclador foram os seguintes: 95 °C por 2 minutos, 30 Ciclos de 94 °C por 50 segundos, 58 °C por 50 segundos e 72 °C por 1 minuto, com uma temperatura final de extensão de 72 °C por 7 minutos. Os oligo iniciadores (GPDH, IL-4, IFN- γ , TNF α) utilizados nesse experimento foram descritos na literatura (BUDHIA et al.,2006) e a IL-10 e IL-17 construídos e sintetizados por MWG-Biotech Inc. (USA), são eles:

GPDH anterógrado 5' –CGGGAAGCTGTGGCGTGATG;

GPDH retrógrado 5' –CTTGGCAGGTTTCTCCAGG;

IFN- γ anterógrado 5'-GAACGGCAGCTCTGAGAAAC;

IFN- γ retrógrado 5'-GCAGCCAGGAGAACCATTAC;

IL-10 anterógrado 5'-CTGTTGCCTGGTCTTCCTGG;

IL-10 retrógrado 5'-CATTTCCGACAAGGCTTGGC;

IL-12 anterógrado 5'-TCAAACCAGACCCACCCAAG;

IL-12 retrógrado 5'-CACAGATGCCATTCACTCC;

IL-4 anterógrado 5'-ATGTACCAGCCACTTCGTCC;

IL-4 retrógrado 5'-GAACAGGTCCTTGCCAG;

TNF α anterógrado 5'-AGAACCCCCTGGAGATAACC;

TNF α retrógrado 5'-AAGTGCAGCAGGCAGAAGAG;

IL-17 anterógrado 5'-TGAGTCTGGTGGCTCTGGTG;

IL-17 retrógrado 5'-GGTGGAGCGCTTGTGATAAT;

Foram realizadas reações de PCR utilizando oligômero iniciador de G3PHD e sem cDNA como controle. Os produtos do PCR foram visualizados sobre luz UV após eletroforese em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio. A análise dos dados foi realizada utilizando Scientific Imaging System software (Kodak). A análise dos géis foi realizada através do software TotalLab TL 100 v. 2006. O software transforma as bandas para pixel. Todos os valores em pixel de GPDH foram considerados normalizadores do restante das citocinas expressas, para assim quantificar as expressões.

6. Análise estatística

Os títulos dos anticorpos em soroconversão foram comparados utilizando análise de variância (ANOVA). O teste LSD foi utilizado para determinar a diferença significativa ($p < 0.05$) entre as médias de cada tratamento, utilizando o programa *Statistix* (2003).

CAPÍTULO 1

Avaliação do efeito de *Bacillus cereus* var. Toyoi na modulação de camundongos vacinados contra Herpesvírus Bovino tipo-5.

1. Introdução

Observa-se um aumento na tecnologia de vacinas empregadas para prevenção de doenças e tratamentos. Em Medicina Veterinária particularmente, essa procura foi maior devido à restrição do uso de antibióticos na alimentação animal, os quais eram utilizados com objetivo de promotores de crescimento assim como na prevenção de doenças infecciosas.

O uso de vacinas convencionais em muitos casos ainda não é satisfatório, porém ainda é a única alternativa para o produtor (PERRIE et al., 2007). As vacinas preparadas a partir de microrganismos vivos ainda possuem muitas reações adversas associadas a sua aplicação (HUANG et al., 2004). Alternativamente, tem se estudado a produção de vacinas a partir de subunidades protéicas ou peptídeos sintéticos, reconhecidos por oferecer mais segurança quanto aos efeitos secundários, porém, sua implementação efetiva ainda é limitada devido a sua baixa imunogenicidade e alto custo (DEMANA et al., 2005; VANGALA et al., 2006). Na atualidade, devido a estes fatores, é improvável que vacinas com microrganismos vivos ou produzidos a partir de subunidades protéicas sejam soluções imediatas para a prevenção das doenças. Assim, em um futuro próximo, o uso de vacinas convencionais parece ser ainda a única solução viável para o controle de enfermidades infecciosas. Uma alternativa viável para a melhoria destas vacinas é a modulação do sistema imunológico através do uso de adjuvantes ou de probióticos.

Probióticos são geralmente definidos como "suplementos microbianos vivos" que podem beneficiar a saúde do hospedeiro (TOMASIK & TOMASIK, 2003). Os efeitos benéficos dos probióticos têm sido observados tanto na resposta imune inata como na adquirida. A imunomodulação dos probióticos tem sido observada na proliferação de leucócitos, na produção de anticorpos, no aumento da atividade fagocitária e ainda da expressão de citocinas. Os mecanismos envolvidos no efeito modulatório dos probióticos ainda não são

totalmente entendidos e podem envolver um ou vários componentes da resposta imune (ERICKSON & HUBBARD, 2000).

A maioria das informações sobre o papel dos probióticos sobre a imunidade foi obtida com o uso de probióticos a base de lactobacilos e bifidobactérias, que são bactérias usadas na alimentação humana e apresentam formas de armazenamento que dificultam sua utilização em animais de produção. *Bacillus cereus* var. Toyoi, por ser um microrganismo que esporula, resiste a condições ambientais o que facilita a sua utilização na produção, conservação e manejo da alimentação animal. Os mecanismos de ação propostos para os probióticos justificam a necessidade da administração contínua destes microrganismos. (GIL-TURNES et al., 1999).

Recentemente, nosso grupo observou que o uso de *Bacillus cereus* var. Toyoi foi capaz de melhorar a eficácia da vacina em camundongos, aves e ovinos (GIL de los SANTOS, 2004; COPPOLA, 2005; ROOS, 2009). O objetivo principal deste trabalho foi estudar o efeito imunomodulador de *Bacillus cereus* var. Toyoi na eficácia de uma vacina experimental inativada contra BoHV-5, bem como avaliar este efeito após a cessação de sua administração.

2. Metodologia Específica

2.1- Probióticos

Bacillus cereus var. Toyoi foi cultivado no Laboratório de Bacteriologia e Imunologia, no Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DEMP), do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), o mesmo teve procedência do Laboratório de Bacteriologia, do Centro de Biotecnologia, UFPel, sendo gentilmente cedido pelo Prof. Carlos Gil-Turnes.

A tecnologia para produção de *Bacillus cereus* var. Toyoi, foi realizada como descrita na metodologia geral, na página 28.

2.2 – Delineamento experimental

Foram utilizados vinte camundongos, Balb C isogênicos, fêmeas, de 21 dias de idade, divididos aleatoriamente em dois grupos de 10 animais.

Os animais do grupo controle foram alimentados com ração comercial isenta de quimioterápicos, enquanto o grupo tratado com probiótico foi

adicionado à ração 1×10^6 esporos viáveis de *B. cereus* var. Toyoi gr^{-1} . Todos os animais passaram por um período de adaptação a dieta, onde receberam a respectiva dieta por sete dias. Após os animais foram imunizados por via subcutânea com 0,25 mL da vacina viral com adjuvante de hidróxido de alumínio (dia 0), sendo revacinados no dia 28 e no dia 114. Os animais foram suplementados com os probióticos até o dia 84 do experimento, após foi suspensa a administração do mesmo e mantidos em experimentação durante mais 60 dias, como mostra a figura 1.

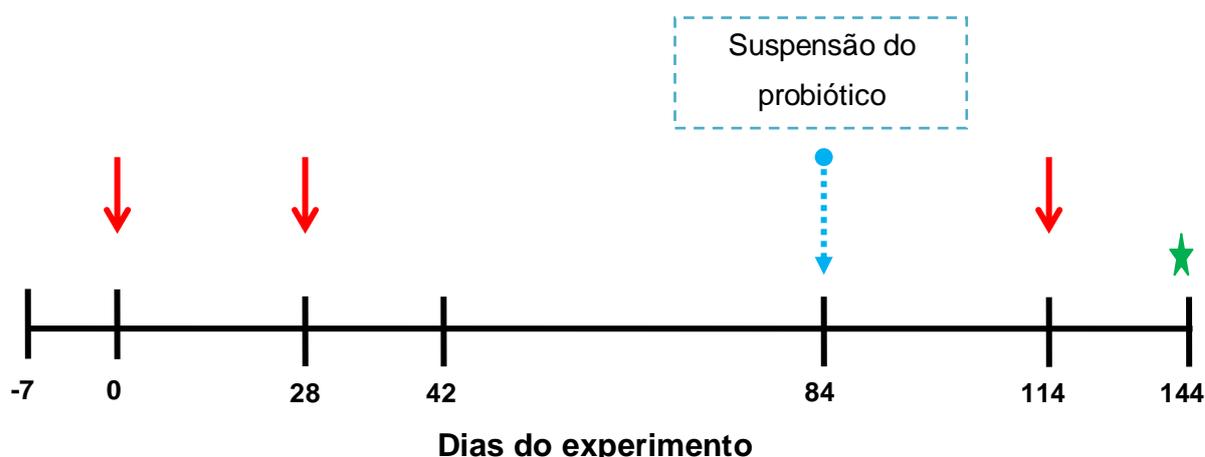


Figura 1: Delineamento experimental em camundongos. Distribuição do experimento em camundongos. Uma semana antes da primeira dose da vacina os animais foram adaptados a respectiva ração. A seta vermelha (continua) indica os dias de vacinação, a seta azul (pontilhada) a suspensão do probiótico, a estrela verde indica o dia do cultivo dos esplenócitos. Nos dias 0, 28, 42, 114 e 144 foi coletado sangue para obtenção do soro.

No dia 144 os animais foram eutanaziados e o baço removido assepticamente, após o mesmo foi macerado e as células processadas como descrito na metodologia geral na página 34.

2.3 – Avaliação da resposta imune

Soroconversão – ELISA

Para detecção dos anticorpos coletou-se sangue do seio venoso retro-orbital nos dias 0, 28, 42, 114 e 144 do experimento. O sangue foi incubado por 1 h a temperatura ambiente, após foi centrifugado a 1.000 g por 3 min. O soro dos animais foi separado, identificado isoladamente e armazenado a temperatura de -20°C .

Os anticorpos foram detectados pela técnica de ELISA. A metodologia utilizada para técnica esta descrita na metodologia geral na página 32.

Soroconversão – Isotipagem

As Imunoglobulinas, IgG1 e IgG2a foram tituladas por ELISA (Sigma A 9044), para realização dessa técnica foram realizados *pool* dos soros, sendo utilizado um *pool* de cada grupo por dia de coleta. A metodologia utilizada para técnica esta descrita na metodologia geral na página 33.

Indução de citocinas

A avaliação da imunidade celular foi realizada em duas partes: Inicialmente para avaliar quais possíveis porções do *Bacillus cereus* var. Toyoi estimula o sistema imune, onde três camundongos foram eutanaziados e os esplenócitos cultivados por 24 horas, após foram estimulados *in vitro* com DNA, sobrenadante de cultivo e com célula íntegra de *B. cereus* var. Toyoi e concanavalina A. No experimento com os animais vacinados, três camundongos de cada grupo foram eutanaziados no dia 84, os esplenócitos cultivados por 24 horas e estimulados com BoHV-5 ou RPMI (controle negativo) . Após 24 horas as células foram retiradas em Trizol e armazenadas a -70°C.

Posteriormente o RNA total foi extraído pelo método do TRIZOL (Invitrogen) de acordo com o protocolo do produto. A síntese de cDNA foi realizada pelo kit da Invitrogen, e o cDNA resultante foi estocado a -20°C.

Reações de PCR utilizando oligômero iniciador de β -actina e sem cDNA foram realizadas como controle. Produtos do PCR foram visualizados sobre luz UV após eletroforese em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio. A análise dos dados foi realizada utilizando Scientific Imaging System software (Kodak). A análise dos géis foi realizada através do software TotalLab TL 100 v. 2006.

A metodologia detalhada é descrita na metodologia geral na página 34.

3. Resultados

3.1 - ELISA

Os animais apresentaram soroconversão contra o antígeno utilizado, e ambos os grupos mostraram o aumento dos níveis de anticorpos decorrentes da vacinação.

Durante o período de suplementação, observou-se que o grupo que recebeu probiótico a base de *B. cereus* var. Toyoi apresentou resposta humoral em média 1,3 vezes superior ($p < 0.05$) quando comparada ao grupo controle. (Fig. 1).

Os mecanismos propostos para ação dos probióticos sugerem a necessidade da sua administração contínua para que seus efeitos sejam observados. A fim de testar esta afirmação quanto ao efeito imunomodulador, foi suspensa a suplementação dos probióticos por 30 dias e após os animais foram revacinados. Observamos que, mesmo com a suspensão dos probióticos, os animais que receberam o suplemento responderam a revacinação com títulos de anticorpos 1,5 vezes mais altos quando comparados ao grupo controle (Fig. 2)

Nas soroconversões (SC) do dia 28 foram observados, 7,1 e 3,7, no dia 42, 8,1 e 5,5, no dia 114, 6,3 e 4,1 e no dia 144, 7,0 e 4,0, respectivamente para o grupo suplementado e controle, em todos os pontos analisados houve diferença significativa entre os grupos.

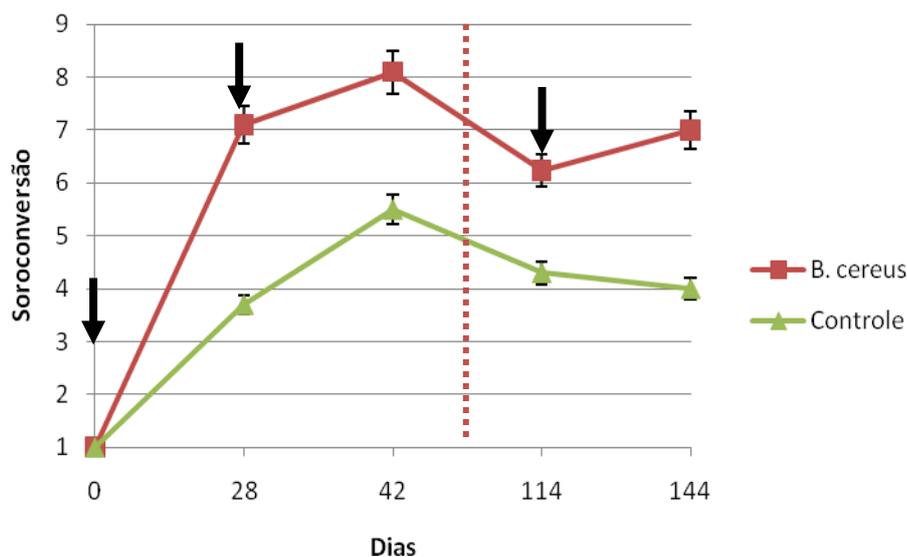


Figura 2. Soroconversão dos animais imunizados com vacina contra BoHV-5. Os dados representam as médias (+/- erro padrão da média) das soroconversões contra BoHV-5 nos animais suplementados com probiótico *Bacillus cereus* var. Toyoi e controle (a seta indica a vacinação e a linha indica a suspensão do probiótico no dia 84).

3.2 - Isotipagem

Para reportar os resultados observados na isotipagem, os resultados foram expressos na forma da razão entre IgG2a e IgG1(IgG2a/ IgG1)

Observou-se mudança do perfil de imunoglobulinas G. Nos animais suplementados com probiótico, os níveis de IgG2a foram 2,7 vezes superiores ao controle no dia 144. Os resultados indicam uma modulação do *Bacillus cereus* var. Toyoi para produção de IgG2a (Th1), enquanto no grupo controle a resposta se manteve através de IgG1 (Th2). Este efeito foi observado a partir do dia 42 se mantendo nos dias 114 e 144, essa conversão de Th2 para Th1 foi detectada nos dias 42, 114 e 144 do experimento, sugerindo que o probiótico modulou a soroconversão em favor de uma resposta Th1 (Tabela 1).

Tabela 1: Modulação da soroconversão produzida pela vacina contra BoHV-5. Os dados representam as médias das soroconversões de IgG1 e IgG2a induzidas pela vacina contra BoHV-5 nos animais controle e suplementados com *B. cereus* var. Toyoi.

Dias	IgG2a/IgG1	
	Controle	<i>B. cereus</i>
0	1,000	1,000
42	0,498	1,129
114	0,475	0,998
144	0,480	1,269

3.3 – Indução de citocinas

Para avaliar o efeito dos probióticos na imunidade celular dos animais, foi utilizada a amplificação de fragmentos de genes de citocinas em cDNA obtido de mRNA, por método semi-quantitativo (Reação em Cadeia da Polimerase - PCR).

Primeiro foi estudado o efeito dos probióticos em esplenócitos de camundongos estimulando os mesmos com DNA, sobrenadantes de cultivos e célula de *B. cereus* var. Toyoi. Como controle da quantidade de cDNA foi utilizada β -actina e de estímulo concavalina (Fig. 3 e 4).

Neste experimento observamos que o DNA, sobrenadante e célula de *B. cereus* foram capazes de estimular a indução de INF- γ , IL-10 (Fig. 3 e 4) Entretanto a intensidade das bandas (expressão) das duas citocinas pareceu ser maior quando o estímulo foi efetuado com o DNA. Com relação a IL-12 foi possível observar sua expressão somente quando os esplenócitos foram estimulados com o DNA e células do *B. cereus* mesmo que em níveis distintos, enquanto que o sobrenadante não foi capaz de estimular sua expressão (Fig. 3 e 4). Estas observações são importantes, pois sugerem que diferentes componentes destes microrganismos podem estar envolvidos na modulação da resposta imunológica.

Quando quantificada a expressão das citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-12 observamos uma maior expressão das mesmas nos animais suplementados com *B. cereus* com relação ao grupo controle (Fig. 5).

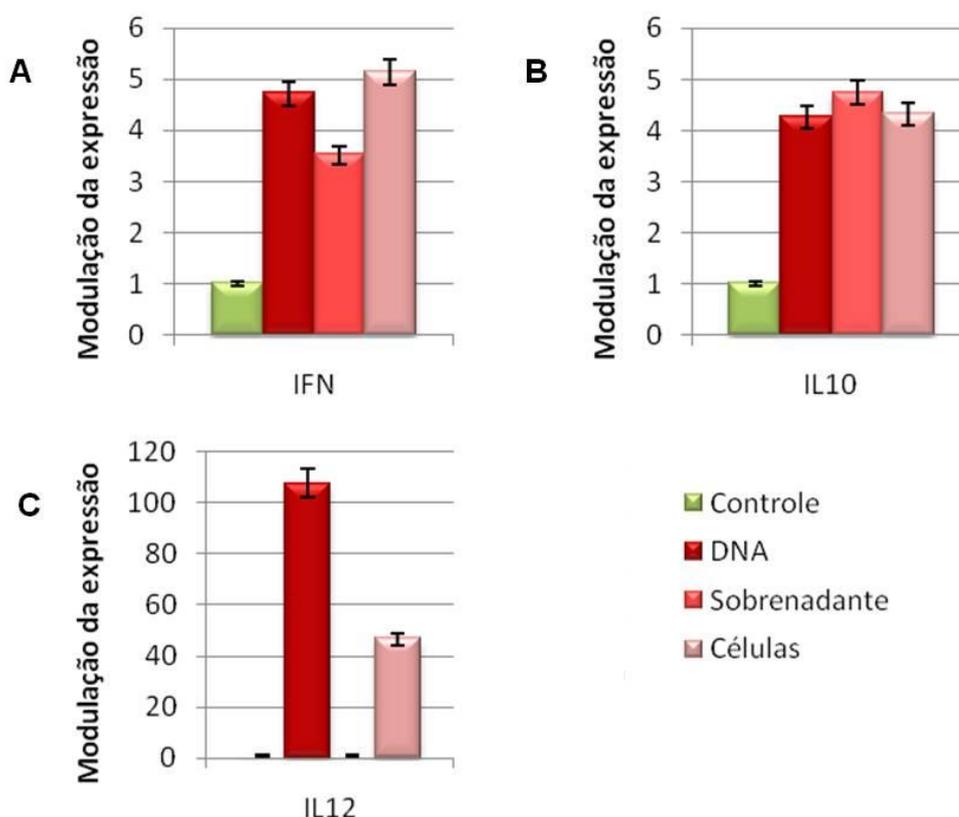


Figura 3. Modulação na expressão de citocinas produzidas em esplenócitos estimulados *in vitro* com Concanavaina A (controle), DNA, Sobrenadante do cultivo e com a célula inteira de *B. cereus* var. Toyoi. (A) IFN- γ , (B) IL-10, (C) IL-12.

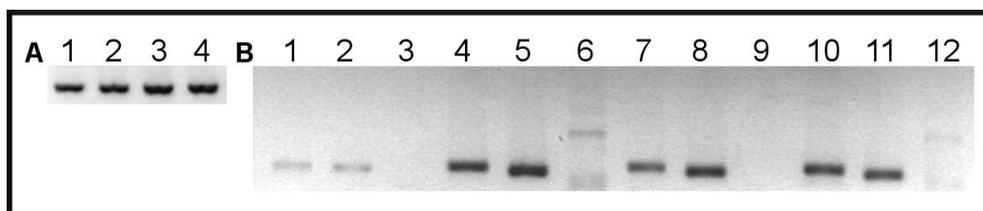


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR amplificados a partir do mRNA de esplenócitos do camundongo estimulados *in vitro*. (A) Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR resultantes da amplificação de β -actina a partir do mRNA de esplenócitos do camundongo estimulados *in vitro* com (1)concanavalina A, (2) DNA, (3) sobrenadante do cultivo e com (4) a célula inteira de *B. cereus* var. Toyoi. (B) Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR resultantes da amplificação de IFN- γ (247 pb), IL-10 (237 pb) e IL-12 (618 pb) a partir do mRNA de esplenócitos dos camundongos. (1-3) estimulados *in vitro* com concanavalina A, controle positivo; (4-6) DNA, (7-9) sobrenadante de cultivo e (10-12) célula inteira de *B. cereus* var. Toyoi.

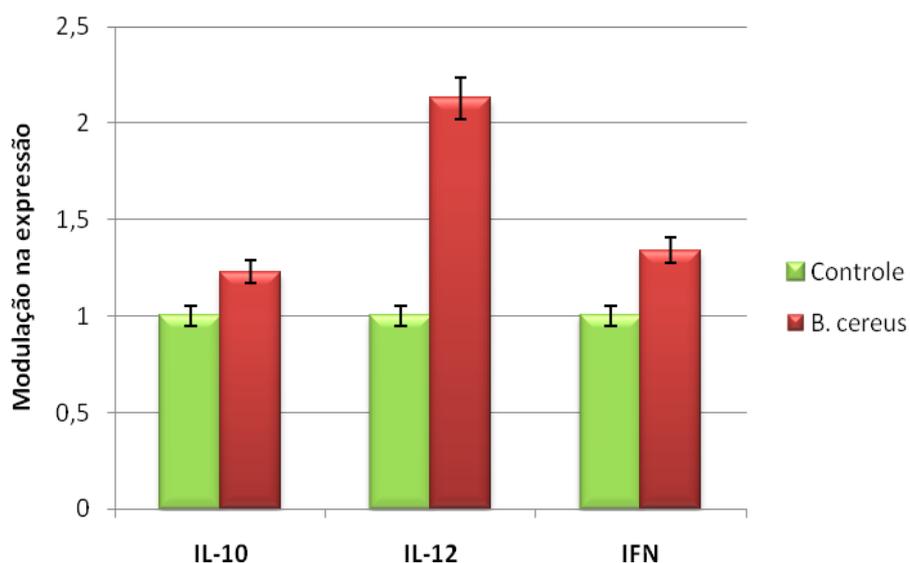


Figura 5: Modulação na expressão de citocinas produzidas em esplenócitos de animais imunizados, suplementados com *B. cereus* var. Toyoi e estimulados com BoHV-5.

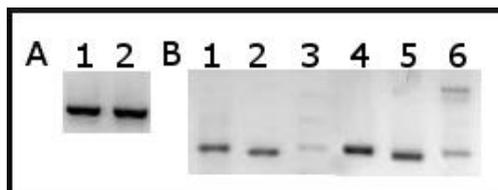


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR amplificados a partir do mRNA de esplenócitos do camundongos imunizados e suplementados com *B. cereus* var. Toyoi (A) Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR resultantes da amplificação de β -actina no grupo controle (1), suplementado com *B. cereus* var. Toyoi (2). (B) Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR resultantes da amplificação de IFN- γ (247 pb), IL-10 (237 pb) e IL-12 (618 pb), respectivamente, a partir do mRNA de esplenócitos do camundongos imunizados, coletados no dia 84 do experimento. (1-3) grupo controle, (4-6) grupo suplementado.

4. Discussão

A utilização de vacinas na prevenção de doenças infecciosas tem sido uma das maiores realizações da comunidade médica (PLOTKIN, 2005). Diferentes abordagens têm sido testadas em busca de respostas imunes mais eficientes, em nosso experimento utilizamos a suplementação com o probiótico *Bacillus cereus* var. Toyoi como uma alternativa para melhorar a eficácia da resposta vacinal.

A maioria dos dados relativos à imunomodulação com probióticos são demonstrados com o uso de *Lactobacillus*. Neste estudo relatamos que *Bacillus cereus* var. Toyoi é capaz de modular a resposta imune em animais vacinados contra BoHV-5 aumentando sua eficiência.

Primeiro observamos que a suplementação com probiótico foi capaz de aumentar a resposta imune à vacina utilizada. O título de anticorpos do grupo suplementado foi superior em todos os pontos estudados. Esta observação corrobora com outros estudos, porém nenhum relata o efeito imunomodulador de *Bacillus cereus* var. Toyoi (AVILA et al, 1998, YASUI et al, 1999). Poucos estudos, porém relatam a influência dos probióticos não ácido lácticos na imunidade. COPPOLA et al. (2005) estudaram o efeito do *Bacillus cereus* var. Toyoi na resposta imune de camundongos vacinados com uma vacina vírica, demonstrando que os títulos de anticorpos induzidos foram significativamente mais altos quando comparado ao grupo controle. Resultados semelhantes foram observados em ruminantes (ROOS et al., 2009), quando *B. cereus* var. Toyoi foi incorporado à dieta de ovinos vacinados contra o BoHV-5,

demonstrando que a soroconversão foi 2 vezes ($p < 0,05$) superior ao grupo controle.

Observamos esse efeito imunológico mesmo após a suspensão do probiótico. Estes resultados são muito importantes porque, em geral, para observar o efeito dos probióticos este deve ser administrado continuamente (VAUGHAN et al., 1999). O título de anticorpos foi 1,5 vezes maior ($p < 0,05$) após a terceira vacinação no grupo suplementado. Mesmo sendo obtido após a interrupção da administração do probiótico, estes dados sugerem que o efeito imunológico ocorre durante a primossensibilização com o antígeno vacinal. A resposta secundária resulta da ativação de linfócitos de memória, ativadas durante a resposta imunológica primária. O ambiente em que ocorre a primossensibilização vai determinar o perfil de resposta secundária que ocorrerá quando o organismo responder ao antígeno pela segunda vez. Neste ambiente as citocinas vão ter papel fundamental no direcionamento da resposta imune para Th1, Th2, Threg ou Th17 (KAUFMANN, 2007).

As citocinas estudadas neste experimento exercem papel fundamental no direcionamento da resposta imune (KAUFMANN, 2007), desta forma influenciando a resposta vacinal. Um dos prováveis mecanismos dos probióticos na imunomodulação é devido à capacidade do microrganismo em estimular a produção de citocinas (MATSUZAKI & CHIN, 2000).

Observamos que a suplementação com *B. cereus* var. Toyoi induziu a expressão das citocinas IFN- γ e IL-12 de forma significativamente superior ao grupo não suplementado. Estas citocinas caracterizam o desenvolvimento de uma resposta Th1 (LI, 2007), sugerindo que o efeito na modulação do perfil de imunoglobulina de IgG1 para IgG2 em resposta ao antígeno vacinal tenha sido por elas mediada. O aumento na proporção de IgG2a/IgG1 no grupo suplementado com probiótico, corresponde a um desvio da resposta Th2, como era de se esperar na resposta a uma vacina inativada tendo hidróxido de alumínio como adjuvante (LI, 2007), para uma resposta Th1. Este efeito é de extrema importância na resposta imune contra algumas doenças víricas onde se faz necessária uma resposta celular para seu efetivo controle (PINTO et al., 2006).

Também observamos uma modulação na expressão de IL-10 tanto nos esplenócitos estimuladas com probióticos, assim como nas células de animais

suplementados estimuladas com antígeno viral (Fig. 2, 3, 4 e 5). A IL-10 é em geral produzida por células Threg e tem como papel principal o controle da amplitude da resposta imune (MATSUZAKI & CHIN, 2000). A observação da modulação desta citocina vem de acordo com o papel imunorregulador dos probióticos em diferentes processos inflamatórios (NIERS et al., 2005). Entretanto, podemos sugerir que o aumento na expressão de IL-10 mediado pelo probiótico influenciou a melhor soroconversão observada (Fig.2), pois esta citocina está relacionada à estimulação e proliferação de linfócitos B (MATSUZAKI & CHIN, 2000).

Os possíveis mecanismos envolvidos no aumento da expressão de citocinas mediados por probióticos não são totalmente conhecidos (GALDEANO & PERDIGON (2004)). Entretanto, neste estudo observamos que quando esplenócitos foram estimulados com a célula bacteriana, e principalmente com o seu DNA houve uma significativa expressão nas citocinas estudadas (Fig. 3). Este padrão de citocinas foi mantido quando células dos animais suplementados com o probiótico foram estimuladas com antígeno vacinal (Fig.5)

É provável que o envolvimento do probiótico com o sistema imunológico ocorra primeiro com células dendríticas no intestino ou outras células apresentadoras de antígeno estimulando sua ativação, e influenciando no seu perfil Th pelo padrão de expressão de citocinas (SHANAHAN, 2004). Uma vez que estas células são ativadas, podem migrar para órgãos linfáticos secundários influenciando a resposta imune em locais distante do trato gastrointestinal (SHANAHAN, 2004). Entretanto, se fazem necessários experimentos complementares para comprovar este mecanismo.

Os dados observados no presente estudo nos permitem concluir que o *Bacillus cereus* var. Toyoi teve efeito modulador na resposta imune vacinal contra o BoHV-5. Os animais suplementados apresentaram soroconversão significativamente superior ao controle, mesmo após a suspensão dos probióticos, sugerindo que seu efeito ocorreu na primossensibilização. A utilização deste probiótico pode contribuir de forma significativa e para melhorar a eficácia de vacinas, especialmente aquelas que dependem da resposta imune protetora celular.

CAPITULO 2

Modulação da resposta imune em camundongos vacinados contra Herpes Vírus Bovino tipo-5 por *Saccharomyces boulardii*.

1. Introdução

Probióticos são designados como produtos que contenham microrganismos viáveis capazes de modificar a microbiota produzindo efeitos benéficos ao hospedeiro. Devido a estes efeitos, eles têm sido utilizados como promotores de crescimento em animais e no controle de desordens intestinais (SCHREZENMEIR & DE VRESE, 2001).

Saccharomyces boulardii é uma levedura não patogênica, utilizada como agente probiótico na prevenção e tratamento de uma variedade de desordens gastrointestinais, incluindo diarreias associadas ao prolongado uso de antibióticos (DAHAN et al. 2003). Em animais suplementados com *Saccharomyces boulardii* tem sido relatado, proteção contra diarreia e enterocolites ocasionada por diversos microrganismos patogênicos (CASTEX et al., 1990; CORTIER et al., 1986; POTHOUKAKIS et al., 1996). Porém nos últimos anos tem se dado atenção especial à capacidade imunomodulatória dos microrganismos probióticos, em especial ao *S. boulardii*.

S. boulardii demonstrou, quando administrado a animais de produção, melhora na eficiência alimentar e no controle de doenças intestinais (GIL de los SANTOS, 2004). A inflamação intestinal é característica comum em colites causadas por uma diversidade de patógenos, assim é possível que a ação de *S. boulardii* na proteção das mucosas ocorra através de eventos que controlem a resposta inflamatória intestinal. Tem sido relatado que a suplementação desta levedura em ratos (BUTS et al., 1990) induziu um aumento significativo de Imunoglobulina A (IgA), sugerindo assim que um dos mecanismos de proteção mediado pela levedura seja o estímulo da resposta imune a nível da mucosa intestinal. Entretanto, os mecanismos pelos quais a levedura age no sistema imune têm sido pouco estudados.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da levedura *S. boulardii* na resposta imune de camundongos imunizados com uma vacina inativada contra

BoHV-5 durante o período de suplementação, bem como após a suspensão da sua administração.

2. Metodologia específica

2.1- Probióticos

Saccharomyces boulardii foi cultivado no Laboratório de Bacteriologia e Imunologia, no Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DEMP), do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), o mesmo teve procedência do Laboratório de Bacteriologia, do Centro de Biotecnologia, UFPel, sendo gentilmente cedido pelo Prof. Carlos Gil-Turnes.

A tecnologia para produção de *Saccharomyces boulardii*, foi realizada como descrita na metodologia geral, na pagina 29.

2.2 – Delineamento experimental

Foram utilizados vinte camundongos, Balb C isogênicos, fêmeas, de 21 dias de idade, divididos aleatoriamente em dois grupos.

Os animais do grupo controle foram alimentados com ração comercial isenta de quimioterápicos, enquanto o grupo tratado com probiótico foi adicionado à ração 1×10^7 UFC de *Saccharomyces boulardii* gr⁻¹. Todos os animais passaram por um período de adaptação a dieta, onde receberam a respectiva dieta por sete dias. Após os animais foram imunizados por via subcutânea com 0,25 mL da vacina viral com adjuvante de hidróxido de alumínio (dia 0), sendo revacinados no dia 28 e no dia 114. Os animais foram suplementados com os probióticos até o dia 84 do experimento, após foi suspensa a administração do mesmo e mantidos em experimentação durante mais 60 dias, como mostra a figura 1.

No dia 144 os animais foram eutanaziados e o baço removido assepticamente, após o mesmo foi macerado e as células processadas como descrito na metodologia geral na página 34.

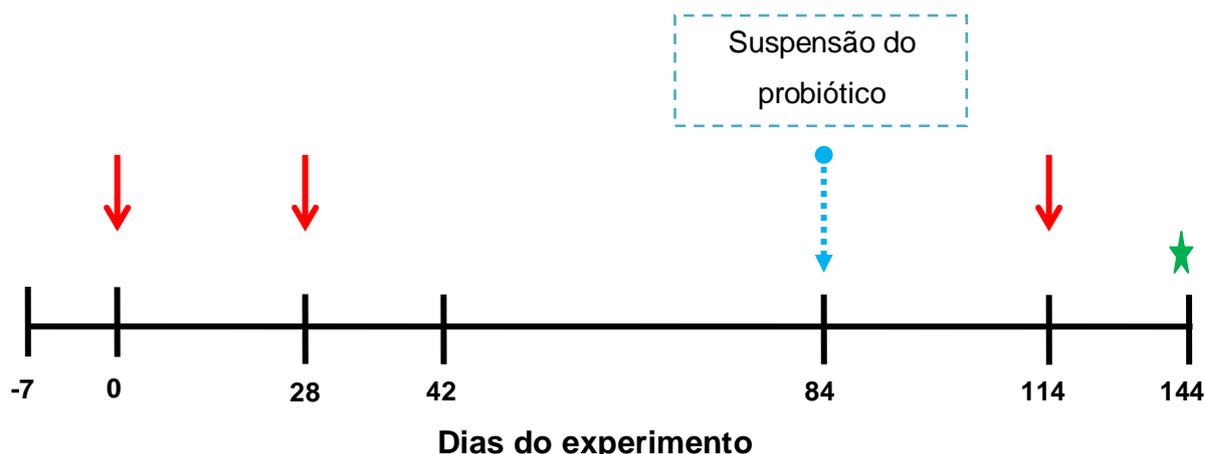


Figura 1: Delineamento experimental em camundongos, distribuição do experimento em camundongos. Uma semana antes da primeira dose da vacina os animais foram adaptados a respectiva ração. A seta vermelha (contínua) indica os dias de vacinação, a seta azul (pontilhada) a suspensão do probiótico, a estrela verde indica o dia do cultivo dos esplenócitos. Nos dias 0, 28, 42, 114 e 144 foi coletado sangue para obtenção do soro.

2.3 – Avaliação da resposta imune

Soroconversão – ELISA

Para detecção dos anticorpos totais coletou-se sangue do seio venoso retro-orbital nos dias 0, 28, 42, 114 e 144 do experimento. O sangue foi incubado por 1 h a temperatura ambiente, após foi centrifugado a 1.000 g por 3 min. O soro dos animais foi separado, identificado isoladamente e armazenado a temperatura de -20°C .

Os anticorpos totais foram detectados pela técnica de ELISA. A metodologia utilizada para técnica esta descrita na metodologia geral na página 32.

Soroconversão – Isotipagem

As Imunoglobulinas, IgG1 e IgG2a foram tituladas por ELISA (Sigma A 9044), para realização dessa técnica foram realizados *pool* dos soros, sendo utilizado um *pool* de cada grupo por dia de coleta. A metodologia utilizada para técnica esta descrita na metodologia geral na página 32.

Indução de citocinas

A avaliação da imunidade celular foi realizada em duas partes: Inicialmente para avaliar quais possíveis porções do *Bacillus cereus* var. Toyoi estimula o sistema imune, onde três camundongos foram eutanaziados e os esplenócitos cultivados por 24 horas, após foram estimulados *in vitro* com DNA, sobrenadante de cultivo e com célula integra de *B. cereus* var. Toyoi e concanavalina A. No experimento com os animais vacinados, três camundongos de cada grupo foram eutanaziados no dia 84, os esplenócitos cultivados por 24 horas e estimulados com BoHV-5 ou RPMI (controle negativo) . Após 24 horas as células foram retiradas em Trizol e armazenadas a -70°C.

Posteriormente o RNA total foi extraído pelo método do TRIZOL (Invitrogen) de acordo com o protocolo do produto. A síntese de cDNA foi realizada pelo kit da Invitrogen, e o cDNA resultante foi estocado a -20°C.

Reações de PCR utilizando oligômero iniciador de β -actina e sem cDNA foram realizadas como controle. Produtos do PCR foram visualizados sobre luz UV após eletroforese em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio. A análise dos dados foi realizada utilizando Scientific Imaging System software (Kodak). A análise dos géis foi realizada através do software TotalLab TL 100 v. 2006.

A metodologia detalhada é descrita na metodologia geral na página 34.

3. Resultados

3.1 – ELISA

Os animais dos dois grupos apresentaram soroconversão contra o antígeno utilizado após a vacinação.

Durante o período de suplementação, os animais vacinados apresentaram título de anticorpos em média 1,7 vezes ($p < 0.05$) superior quando comparado ao grupo controle (Fig. 2). Após a suspensão da administração dos probióticos observou-se em todos os animais suplementados o aumento dos níveis de anticorpos devido à revacinação, enquanto nos animais do grupo controle esse aumento do título de anticorpos não foi observado. Nos animais suplementados com *S. boulardii*, os títulos de

anticorpos foram significativamente mais elevados quando comparados ao controle (Fig.2). No grupo suplementado foi observada a tendência da resposta imune em permanecer elevada, enquanto a tendência do grupo controle foi uma redução dos níveis de anticorpos. As soroconversões mais altas contra BoHV-5 registraram-se no dia 42 do experimento, sendo 9,01 no grupo que recebeu *S. boulardii*, 5,51 no grupo controle.

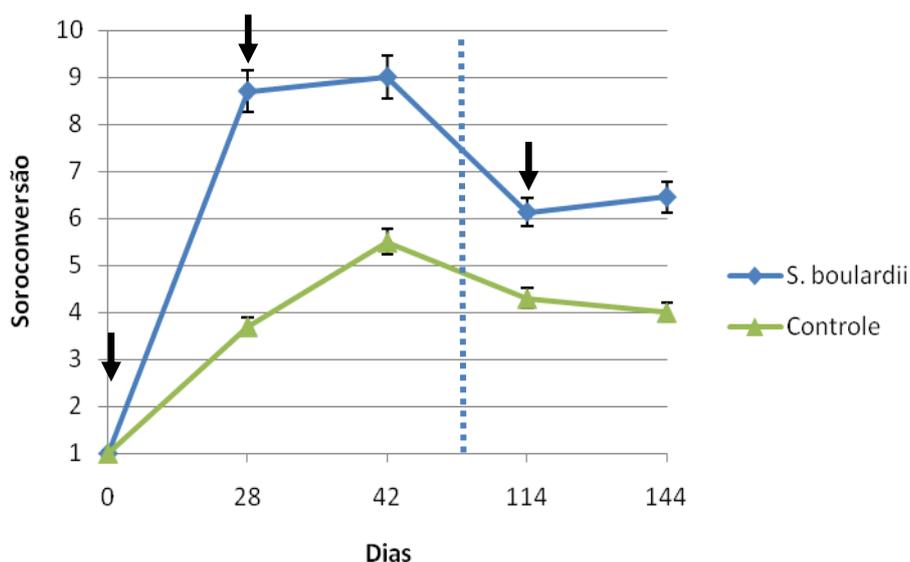


Figura 2: Soroconversão nos animais imunizados com vacina contra BoHV-5. Os dados representam as médias (+/-erro padrão da média) das soroconversões nos animais suplementados com *S. boulardii* e controle (a seta indica a vacinação e a linha pontilhada indica a suspensão do probiótico no dia 84).

3.2 - Isotipagem

Os resultados estão expressos na forma da razão entre IgG2a e IgG1(IgG2a/ IgG1). Observou-se mudança do perfil de imunoglobulinas, nos animais suplementados com probiótico os títulos de IgG2a foram superiores ao grupo controle. (Tabela 1).

Tabela 1: Modulação da soroconversão produzida pela vacina contra BoHV-5. Os dados representam as médias das soroconversões de IgG1 e IgG2a induzidas pela vacina nos animais controle e suplementados com *S. boulardii*.

IgG2a/IgG1		
Dias	Controle	<i>S. boulardii</i>
0	1,000	1,000
42	0,498	0,759
114	0,475	0,732
144	0,480	0,940

3.3 – Expressão de citocinas

Para avaliar o efeito dos probióticos na imunidade celular dos animais, foi utilizada a amplificação de fragmentos de genes de citocinas em cDNA obtido de mRNA, por um método semi-quantitativo (Reação em Cadeia da Polimerase - PCR).

Primeiro foi estudado o efeito dos probióticos em esplenócitos de camundongos não imunizados e estimulando os mesmos com DNA, sobrenadantes de cultivos e célula de *S. boulardii*. Como controle da quantidade de cDNA foi utilizada β -actina e de estímulo concavalina A (Fig. 3 e 4).

Quando testado DNA, sobrenadante e células de *S. boulardii* observamos expressão das três citocinas independente do estímulo induzido nos esplenócitos (Fig. 3 e 4). Estes dados são importantes, pois sugerem que diferentes componentes destes microrganismos podem estar envolvidos na modulação da resposta imunológica.

Neste experimento observamos que a expressão de citocinas nos esplenócitos dos animais suplementados com os probióticos e controle responderam de forma distinta ao antígeno vacinal.

Nos animais suplementados com *S. boulardii* a expressão de citocinas IFN- γ e IL-12 foram inferiores ao controle.

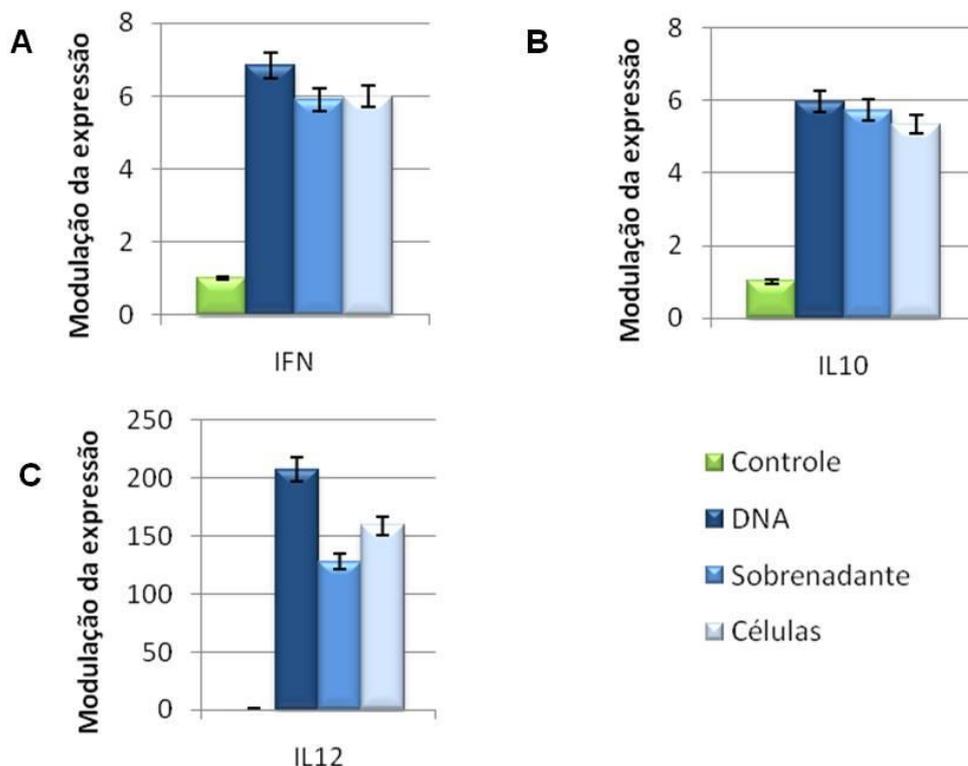


Figura 3. Modulação na expressão de citocinas produzidas em esplenócitos estimulados *in vitro* com Concanavalina A (controle), DNA, Sobrenadante do cultivo e com a célula integra de *S. boulardii* (A) IFN- γ , (B) IL-10, (C) IL-12.

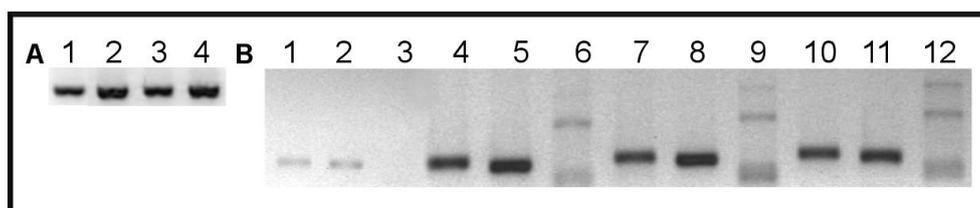


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR amplificados a partir do mRNA de esplenócitos do camundongos estimulados *in vitro* (A) Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR resultantes da amplificação de β -actina a partir do mRNA de esplenócitos do camundongos estimulados *in vitro* com (1) concanavalina A, (2) DNA, (3) sobrenadante do cultivo e (4) com a célula integra de *S. boulardii*. (B) Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR resultantes da amplificação de IFN- γ (247 pb), IL-10 (237 pb) e IL-12 (618 pb) a partir do mRNA de esplenócitos. (1-3) Esplenócitos de camundongos estimulados *in vitro* com concanavalina A, controle positivo; (4-6) Esplenócitos de camundongos estimulados *in vitro* com DNA de *S. boulardii*; (7-9) Esplenócitos de camundongos estimulados *in vitro* com sobrenadante de cultivo de *S. boulardii*; (10-12) Esplenócitos de camundongos estimulados *in vitro* com célula integra de *S. boulardii*.

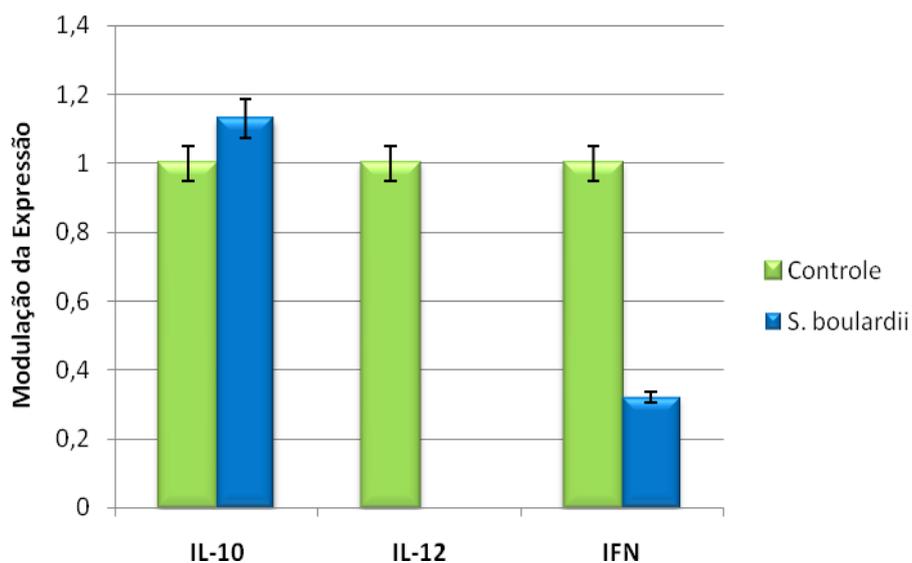


Figura 5: Modulação na expressão de citocinas produzidas em esplenócitos de animais imunizados, suplementados com *S. boulardii* e estimulados com BoHV-5.

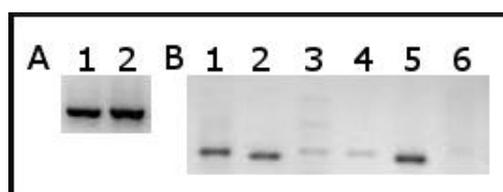


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR amplificados a partir do mRNA de esplenócitos do camundongos imunizados e suplementados com *S. boulardii*. (A) Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR resultantes da amplificação de β -actina no grupo controle (1), suplementado com *Saccharomyces boulardii* (2). (B) Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR resultantes da amplificação de IFN- γ (247 pb), IL-10 (237 pb) e IL-12 (618 pb), respectivamente, a partir do mRNA de esplenócitos do camundongos imunizados, coletados no dia 84 do experimento. (1) IFN- γ ; (2) IL-10; (3) IL-12 do grupo controle, (4) IFN- γ ; (5) IL-10; (6) IL-12 do grupo suplementado.

4. Discussão

A utilização de probióticos para incrementar a resposta imune tem sido estudada nos últimos anos, com ênfase para o estudo de bactérias ácido lácticas (VAUGHAN et al., 1999; PERDIGÓN et al., 1999; HERICH & LEVKUT, 2002). Em nosso estudo utilizamos a levedura *Saccharomyces boulardii*, que é

um microrganismo que possui característica que resistem as condições adversas encontradas nos sistemas de produção animal (DOYLE, 2001).

Observamos que a suplementação com probiótico foi capaz de ampliar a resposta imune vacinal de forma significativa chegando a induzir o aumento em 2,35 vezes no dia 28, quando comparada ao controle. Em um estudo com *S. boulardii* na resposta imune de camundongos imunizados com uma vacina vírica, foi observado um aumento significativo nos títulos de anticorpos quando comparados aos do grupo controle (COPPOLA et al., 2005). Em ovinos suplementados com *S. boulardii* observou-se resultados semelhantes, evidenciando soroconversão significativamente superior ao grupo controle (ROOS et al., 2009).

A resposta imune secundária resulta da ativação de linfócitos de memória, que possuem longa duração e são ativadas durante a resposta imunológica primária, conseqüentemente, a resposta secundária é mais eficiente, porém segue o mesmo padrão (Th1 ou Th2) da resposta primária (KAUFMANN, 2007). Mesmo após a parada da suplementação do probiótico após a terceira vacinação, o título de anticorpos no grupo suplementado foi significativamente maior (1,6 vezes) do que controle. Desta forma, podemos sugerir que o efeito da imunomodulação ocorreu na primo sensibilização vacinal, sugerindo que houve uma estimulação superior das células de memória nos animais suplementados com o probiotico (KAUFMANN, 2007). Estas observações nos permitem sugerir que o efeito imunomodulador do *S. boulardii* ocorra no primeiro contato do sistema imune com o antígeno vacinal. Estes resultados sugerem que não existe a necessidade de administração constante dos probióticos para observação de seu efeitos (GIL-TURNES et al., 1999) quando nos referimos ao efeito destes na resposta imune.

Os resultados comprovam a modulação do probióticos para produção de IgG2a (Th1), enquanto o grupo controle tinha maior produção de IgG1 (Th2). Houve um desvio da resposta tipo Th2 para uma resposta Th1, o que corresponde a um maior valor na proporção de IgG2a/IgG1 no grupo suplementado com probiótico quando comparado ao grupo controle, sendo a resposta tipo Th1 em geral desejável para combater aos antígenos virais (PINTO et al., 2006).

Observamos que os componentes do cultivo de *S. boulardii* foram capazes de induzir a expressão das citocinas nos esplenócitos de camundongos, sugerindo que os diferentes componentes deste microrganismo podem estar envolvidos na modulação da resposta imune, concordando com os nossos achados GALDEANO & PERDIGON (2004) também relatam a possibilidade de componentes de cultivos estimularem a resposta imune.

Quando comparados estes dados com os da isotipagem em que os animais suplementados com *S. boulardii* apresentaram uma tendência para IgG2a (Th1), observamos que elementos distintos, aos induzidos por *B. cereus* (dados observados e apresentados no capítulo 1), estariam envolvidos a modulação para uma resposta com perfil Th1.

Observamos uma maior expressão de IL-10 tanto em células estimuladas com probióticos, assim como nas células de animais suplementados, quando comparados com o grupo controle. A expressão de IL-10 nos animais suplementados evidencia o papel imunorregulador dos probióticos em diferentes processos inflamatórios através desta citocina (SHEIL et al., 2007; VAARALA, 2003). A IL-10 está relacionada com a imunidade humoral, estimulando à proliferação de leucócitos B e conseqüentemente a produção de anticorpos (MATSUZAKI & CHIN, 2000).

NIERS (2005) sugere em seu estudo com bactérias ácido lácticas, que o efeito observado na supressão da resposta tipo Th2 pode ter sido mediado por funções imunorregulatórias, não ligadas ao aumento da secreção de IFN- γ ou IL-12, mas pela indução da secreção de citocinas regulatórias como a IL-10. Essas informações concordam com nossos resultados, uma vez que observamos a supressão da resposta Th2 quando comparado ao grupo controle e o aumento na expressão da IL-10.

Os resultados obtidos na soroconversão dos anticorpos totais, na isotipagem mudando o perfil das IgG, assim como na expressão de citocinas com os componentes da levedura concordam com a mudança do tipo de resposta de Th2 para Th1. Um importante atributo funcional das células do sistema imune é a capacidade de sintetizar e secretar citocinas. Após a ligação em receptores específicos nas células alvos, essas proteínas agem regulando o crescimento e a diferenciação das células Th0. O desenvolvimento da resposta tipo Th1 ou Th2 depende diretamente da gama de citocinas

estimuladas. As alterações no perfil de citocinas são sustentadas pela hipótese de que os probióticos possuem a capacidade de influenciar nos níveis de expressão das citocinas (HALLER et al., 2000). No entanto, a capacidade de modular o sistema imunológico para a produção de citocinas reguladoras é dependente do microrganismo, concentração e período de administração (HART et al., 2004). Os dados observados nesse experimento sugerem que a modulação da resposta imune pelo *Saccharomyces boulardii* esta relacionada com a expressão da IL-10, já que o grupo suplementado não apresentou diferenças de expressões significativas de outras citocinas estudadas, comparado ao grupo controle.

Dessa forma podemos concluir que o *S. boulardii* apresentou efeito na imunomodulação de animais vacinados, influenciando de maneira favorável a soroconversão, sendo significativamente mais alta, em todos os pontos estudados, quando comparada ao grupo controle.

CAPITULO 3

Avaliação do efeito dos probióticos *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *Toyoi* na resposta imune em ovinos.

1. Introdução

O setor de produção de carne contribui expressivamente na economia brasileira tendo em vista que o produto brasileiro tem grande aceitabilidade no exterior. O efetivo de ovinos no Brasil no ano de 2007 foi de 15 milhões de animais, apresentando aumento de 1,4% com relação ao ano anterior. Do total de animais, 55% destes estão na Região Sul, sendo o principal estado produtor de ovinos (IBGE, 2007).

A região que mais cresceu foi a Sudeste (11,7%), seguida pelo Centro-oeste, Norte e Sul, 10%, 5% e 2,5%, respectivamente. Desde 1997, o rebanho de ovinos brasileiro teve um aumento de 11,7% até 2007 (IBGE, 2007). Esses dados demonstram a tendência de crescimento do consumo no mercado interno, o qual tem sido justificado pela formação de associações comerciais que estão investindo no segmento através de marketing, treinamento, tecnologia, sanidade e outros pré-requisitos para o setor (NOGUEIRA & JUNIOR, 2006).

A criação de ovinos é encontrada em várias regiões do país, sendo animais de fácil adaptação em vários sistemas de produção. Possuem algumas características que tornam vantajosa a sua criação: produção de lã, carne e leite, além da facilidade de manejo e adaptação, quando comparado como, por exemplo, a bovinocultura (SELAIVE-VILLARROEL et al., 1997; CEZAR et al., 2004). Devido a seu porte pequeno e facilidade de manejo, os ovinos são também utilizados como modelo experimental para posterior transposição de resultados a outras espécies (MIKEL et al., 2004).

Nos últimos anos tem aumentado a procura por uma alternativa aos antibióticos utilizados na alimentação animal, sendo os probióticos a mais plausível, com dados encorajadores em camundongos, peixes, aves, suínos e bovinos (COPPOLA et al., 2004; GIL-TURNES, 1999; ANTUNOVIC et al., 2005). Os probióticos são utilizados na prevenção e no tratamento de doenças, na regulação da microbiota intestinal, no controle de distúrbios do metabolismo

gastrointestinal, na inibição da carcinogênese, como promotores de crescimento e atualmente como imunomoduladores.

Recentes pesquisas para avaliar a resposta imune de animais alimentados com dietas suplementadas com probióticos, revelaram, em sua grande maioria, os efeitos benéficos destes microrganismos ao estimularem de alguma maneira a resposta imune do hospedeiro, seja a resposta inata, a celular ou a humoral (ERICKSON & HUBBARD, 2000). Na grande maioria dos trabalhos utilizaram-se espécies monogástricas, tais como camundongos, aves e suínos, o que indica a necessidade da avaliação dos probióticos em espécies ruminantes.

A maioria dos estudos utilizou lactobacilos ou bifidobactérias, bactérias usadas na alimentação humana e que apresentam restrições em sua comercialização e administração na alimentação animal (GIL-TURNES, 1999; DOYLE, 2001). O uso de microrganismos não ácido-láticos como probióticos, tais como *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *toyoi*, apresentam propriedades que favorecem sua utilização na alimentação animal. Resultados reportados no capítulo 1 e 2 em camundongos sugerem que a resposta imune parece ser influenciada durante a primeira imunização.

Baseado nos resultados obtidos em ovinos e em outras espécies em estudos anteriores nosso objetivo neste estudo foi demonstrar os possíveis mecanismos pelos quais *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *toyoi* modulam a resposta imune em ovinos.

2. Metodologia específica

2.1 – Produção dos probióticos

Ambos probióticos foram produzidos no Laboratório de Bacteriologia, no Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DEMP), do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

Os microrganismos utilizados, *Bacillus cereus* var. *Toyoi* e *Saccharomyces boulardii*, tiveram procedência do Laboratório de bacteriologia do Centro de Biotecnologia, UFPel.

Para produção dos microrganismos foi utilizado um fermentador de bancada, produzido pela B. Braun Biotech International – BIOSTAB® - B, com

capacidade para fermentar até 10L. A tecnologia para produção dos probióticos foi realizada como descrita na metodologia geral, descrita nas páginas 28 e 29.

2. 2 – Delineamento experimental

Foram utilizados trinta ovinos, Corriedale com Ideal, fêmeas, de 5 meses de idade, divididos aleatoriamente em três grupos.

Todos os animais foram alimentados com ração comercial isenta de quimioterápicos, com 2% do seu peso vivo/dia. Os animais dos grupos A e B receberam 1×10^7 UFC de *S. boulardii* gr^{-1} de ração e 1×10^6 esporos viáveis de *B. cereus* var. Toyoi gr^{-1} , respectivamente, em administração oral e individual diariamente. Todos os animais passaram por um período de sete de adaptação ao probiótico. Após os animais foram imunizados por via intramuscular com 3 mL da vacina viral com adjuvante oleoso (dia 0), sendo revacinados no dia 21 e no dia 42. Os animais foram suplementados com os probióticos até o dia 28 do experimento, após foi suspensa a administração do mesmo e mantidos em experimentação durante mais 35 dias, como mostra a figura 1.

Nos dias 0, 28 e 63 foi coletado sangue da veia jugular para posterior cultivo dos leucócitos periféricos.

No dia 63 um animal de cada grupo foi eutanaziado e o baço removido assepticamente, após o mesmo foi macerado e as células processadas como descrito na metodologia geral na página 34.

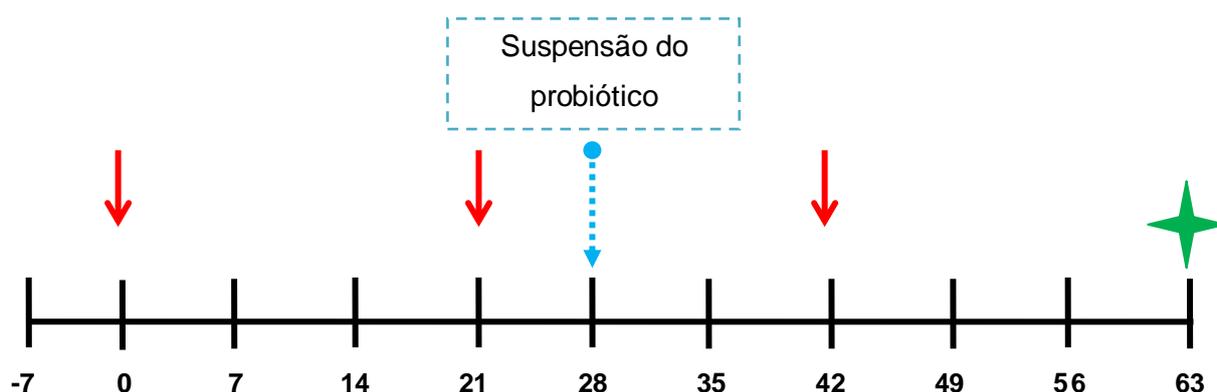


Figura 1: Delineamento experimental em ovinos, distribuição dos dias do experimento com ovinos. Uma semana antes da primeira dose da vacina os animais foram adaptados aos probióticos. A seta vermelha (contínua) indica os dias de vacina, a seta azul (pontilhada) a suspensão do probiótico, a estrela verde indica o dia do cultivo dos esplenócitos. Nos dias 0,

28 e 63 foi coletado sangue para cultivo dos leucócitos periféricos, nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 42, 56 e 63 foi coletado sangue para obtenção de soro.

2.4 – Avaliação da imunidade

Soroconversão – ELISA

Para detecção dos anticorpos totais coletou-se sangue da jugular semanalmente dos animais do experimento. O sangue foi incubado por 1 h a temperatura ambiente, após foi centrifugado a 1.000 g por 3 min. O soro dos animais foi separado, identificado e armazenado isoladamente a temperatura de – 20°C. Os anticorpos totais foram detectados pela técnica de ELISA. A metodologia utilizada para técnica esta descrita na metodologia geral na página 32.

Soroneutralização

Para obter o título de anticorpos neutralizantes foi realizada a técnica de soroneutralização, coletou-se sangue da jugular nos dias 0, 14, 42 e 63 do experimento. O sangue foi incubado por 1 h a temperatura ambiente, após foi centrifugado a 1.000 g por 3 min. O soro dos animais foi separado, identificado e armazenado isoladamente a temperatura de – 20°C. Para essa avaliação foram utilizados *pools* dos soros dos animais de cada grupo em cada dia coleta. A metodologia utilizada para técnica esta descrita na metodologia geral na página 33.

Expressão de citocinas

Para avaliar a expressão de citocinas inicialmente foi realizado o cultivo de leucócitos periféricos a partir do sangue periférico de um animal de cada grupo, o sangue foi coletado com anticoagulante da veia jugular nos dias 0, 28 e 63 do experimento. Posteriormente, foi realizado o cultivo dos esplenócitos a partir do baço de um animal de cada grupo, no dia 63 do experimento. Após as células foram cultivados por 24 horas e estimulados com BoHV-5 ou RPMI (controle negativo) passadas 24 horas do estímulo as células foram retiradas

em Trizol e armazenadas a -70°C , conforme metodologia descrita na página 34 do item metodologia geral.

Posteriormente o RNA total foi extraído pelo método do TRIZOL (Invitrogen) de acordo com o protocolo do produto. A síntese de cDNA foi realizada pelo kit da Invitrogen segundo seu protocolo, e o cDNA resultante foi estocado a -20°C . Reações de PCR utilizando oligômero iniciador de GPDH e sem cDNA foram realizadas como controle. Produtos do PCR foram visualizados sobre luz UV após eletroforese em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio. A análise dos dados foi realizada utilizando Scientific Imaging System software (Kodak). A análise dos géis foi realizada através do software TotalLab TL 100 v. 2006. A metodologia detalhada é descrita na metodologia geral na página 34.

3. Resultados

3.1 - ELISA

Os animais dos três grupos apresentaram soroconversão contra o antígeno utilizado e todos os grupos mostraram aumento dos níveis de anticorpos devido à revacinação, independentemente da suplementação recebida.

Durante o período de suplementação observou-se que o grupo que recebeu probiótico de *B. cereus* var. Toyoi apresentou uma resposta humoral significativamente superior ao grupo controle em todos os pontos analisados.

O grupo suplementado com *Saccharomyces boulardii* apresentou soroconversão superior ao grupo controle nos dias 7, 14 e 28. Com relação ao grupo suplementado com *B. cereus* var. Toyoi as soroconversões foram significativamente ($p < 0.05$) inferiores nos dias 21 e 56 (Fig. 2). Entretanto, este grupo apresentou soroconversões crescentes durante todo o experimento. Dado este semelhante ao observado em camundongos com o adjuvante oleoso (dados não mostrados).

Mesmo após a suspensão da administração dos probióticos observou-se em todos os animais dos grupos suplementados uma maior resposta humoral á

revacinação. Nos animais do grupo controle esse aumento na soroconversão foi inferior aos animais suplementados, sendo mais evidente no ultimo dia de coleta ($p < 0.05$) (Fig.2). As soroconversões mais altas contra BoHV-5 registraram-se na ultima coleta do experimento para todos os grupos, sendo 3,9 no grupo suplementado com *B. cereus* var. Toyoi, 3,5 no grupo que recebeu *S. boulardii* e 2,7 no grupo controle.

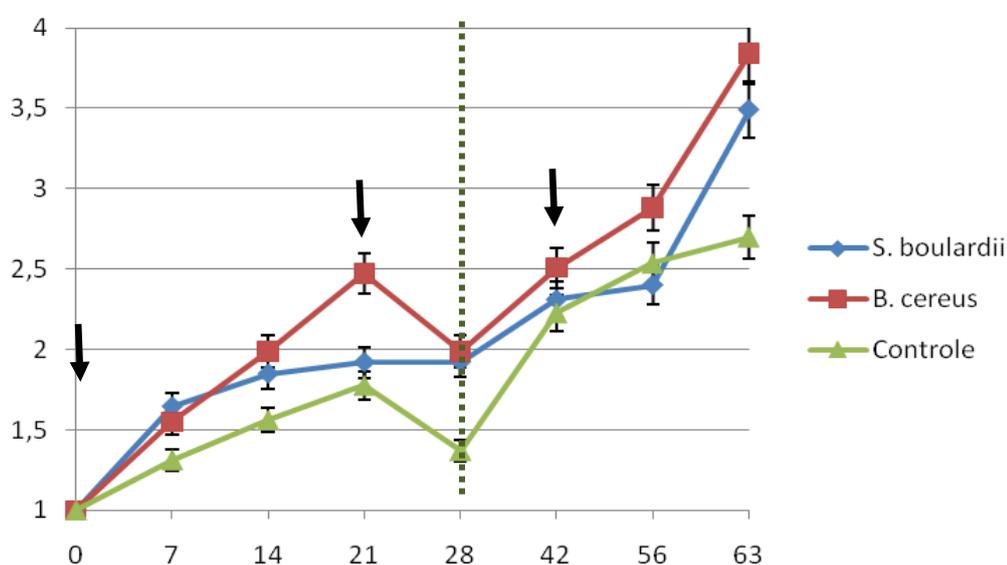


Figura 2: Soroconversão produzida nos animais imunizados com vacina contra BoHV-5. Os dados representam as médias (+/-erro padrão da média) das soroconversões contra BoHV-5 induzidas pela vacina nos animais suplementados com *S. boulardii*, *B. cereus* var. Toyoi e controle (a seta indica a vacinação e a linha pontilhada indica a suspensão do probiótico no dia 28).

3.2 - Soroneutralização.

Observamos que o probiótico *B. cereus* var. Toyoi, apresentou maiores títulos de anticorpos (\log_2) neutralizantes a partir do dia 14 (Fig. 3), permanecendo assim até o final do experimento mesmo quando a administração do mesmo já havia sido suspensa. O *S. boulardii* apresentou

maiores títulos quando comparado ao grupo controle apenas no dia 14 (Fig. 3), após a segunda dose da vacina os títulos do grupo controle e *S. boulardii* se equipararam, sendo que o grupo suplementado com *B. cereus* var. Toyoi, permaneceu mais alto comparado aos demais grupos.

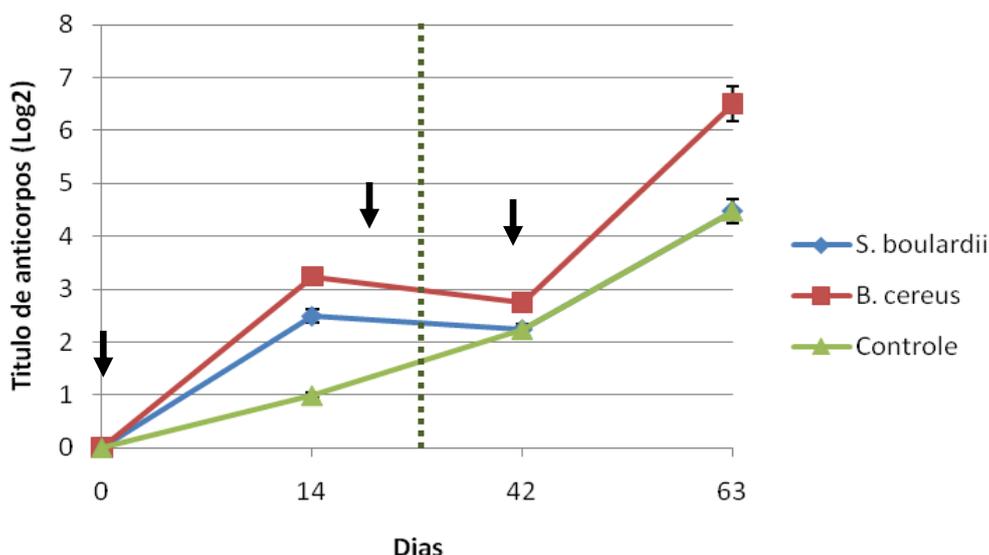


Figura 3: Título de anticorpos soroneutralizantes (\log_2) nos ovinos vacinados contra BoHV-5 e suplementados com *S. boulardii*, *B. cereus* var. Toyoi. O título foi determinado pelo teste de soroneutralização nos dias 0, 14, 42 e 63. Os dados representam as médias (+/-erro padrão da média), (a seta indica a vacinação e a linha pontilhada indica a suspensão do probiótico no dia 28).

3.3 – Expressão de citocinas

Quando avaliado o perfil de citocinas induzidos nos leucócitos periféricos, observamos que os animais suplementados com *B. cereus* var. Toyoi, expressaram maiores níveis de TNF, IL-10, IFN- γ , durante o período de suplementação, quando comparados ao grupo controle (Fig. 4 e 5). Após a suspensão do probiótico os níveis de IL-10 mantiveram-se elevados, entretanto os níveis de expressão de TNF e IFN- γ equipararam-se aos do grupo controle.

Quando estudamos a expressão de IL-17 no grupo suplementado com *B. cereus* observamos que sua expressão foi inferior ao grupo controle durante a suplementação, entretanto, ao suspender o probiótico observamos o aumento na sua expressão (Figuras 4 e 5).

Com relação a IL-4 observamos um padrão semelhante a IL-17, porém com níveis de expressão inferiores. Observamos que no dia 28, período com suplementação e imunização, houve uma redução de sua expressão, e um aumento de sua expressão após a suspensão da suplementação (Figuras 4 e 5).

Ao estudarmos os animais suplementados com *S. boulardii*, observamos uma modulação nas citocinas estudadas. Observamos modulações semelhantes das citocinas IFN- γ , TNF e IL-10, durante a suplementação do probiótico.

Quanto a expressão de TNF observamos uma maior expressão durante o período de suplementação, entretanto, após a cessação os níveis reduziram, porém superiores ao grupo controle.

Com relação a IL-10 observamos que durante a suplementação os níveis desta mantiveram-se semelhantes ao grupo controle, sendo que após a suspensão do probiótico esses níveis reduziram de forma significativa.

Ao estudarmos o IFN- γ , observamos que os níveis durante a suplementação foram superiores ao grupo controle, entretanto diminuindo no período pós suplementação (Figuras 4 e 5).

A modulação da citocina IL-4 foi evidenciada no dia zero com um aumento de sua expressão em relação ao grupo controle, porém no dia 28 observou-se uma menor expressão comparada ao grupo controle. Após a suspensão da administração do probiótico esses níveis voltaram a aumentar, porém se mantiveram ainda inferiores ao grupo controle (Figuras 4 e 5).

A expressão de IL-17 apresentou um padrão distinto das demais, tendo sua expressão superior ao grupo controle no dia zero, diminuindo no dia 28 e no dia 63 não diferindo significativamente do controle (Figuras 4 e 5).

Ao analisarmos os resultados obtidos a partir do cultivo de esplenócitos (após suspensão dos probióticos) estimulados com vírus, observamos que o animal do grupo que recebeu *B. cereus* var. Toyoi apresentou expressão significativamente superior das citocinas IL-17 (22 vezes), IFN- γ (18 vezes), IL-10 (11 vezes) e IL-4 (20 vezes) ao grupo controle. Entretanto, na avaliação da expressão das citocinas TNF não observamos diferença ao grupo controle (Figura 5).

O grupo suplementado com *S. boulardii*, apresentou o padrão de expressão de citocinas em esplenócitos (após a suspensão dos probióticos) superior para as citocinas IL-17 e IL-10, sendo de 18 e 22 vezes superiores ao controle, respectivamente. Entretanto, com relação as citocinas TNF, IFN- γ e IL-4 não houve diferença na expressão ao comparar com o grupo controle (Figura 5).

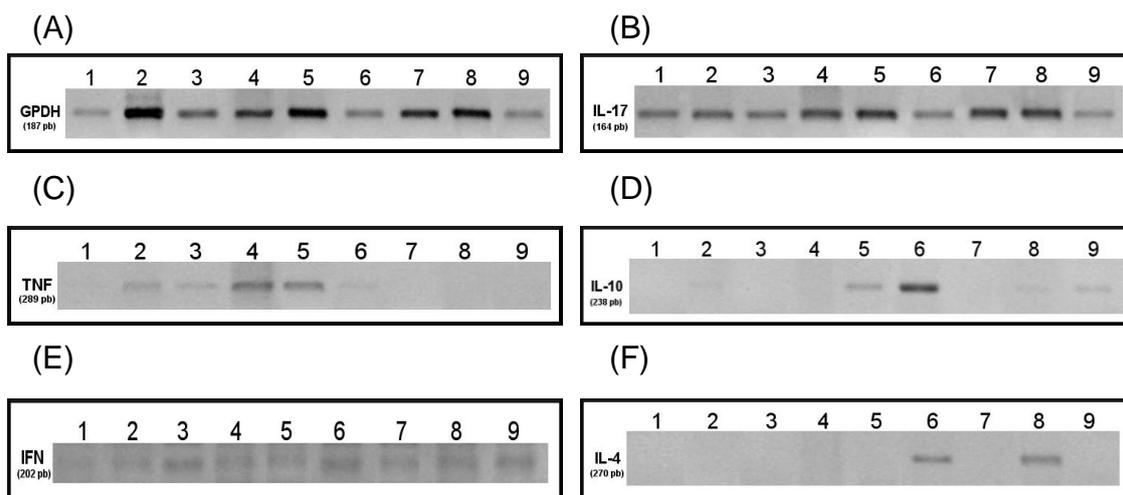


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR amplificados a partir do mRNA de leucócitos periféricos de ovinos imunizados com BoHV-5. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR resultantes da amplificação de (A) GPDH, (B) IL-17, (C) TNF, (D) IL-10, (E) IFN- γ e (F) IL-4. As bandas representam (1, 2 e 3) grupo *S. boulardii*, nos dia 0, 28 e 63 respectivamente; (4, 5 e 6) grupo *B. cereus* var Toyoi, nos dia 0, 28 e 63 respectivamente e (7, 8 e 9) grupo controle nos dia 0, 28 e 63 respectivamente.

Ao compararmos os resultados obtidos através da expressão de citocinas nos leucócitos periféricos e esplenócitos, mesmo considerando que não foram obtidos do mesmo animal, obtivemos resultados diferentes na modulação da expressão das citocinas estudadas.

As citocinas IL-17 e IFN- γ apresentaram um padrão de modulação distinto sendo expressas em maiores níveis nos esplenócitos enquanto nos leucócitos periféricos não foram detectadas diferenças de expressão em relação aos controles. As citocinas IL-4, TNF e IL-10 apresentaram padrão de expressão semelhante nas duas populações de células.

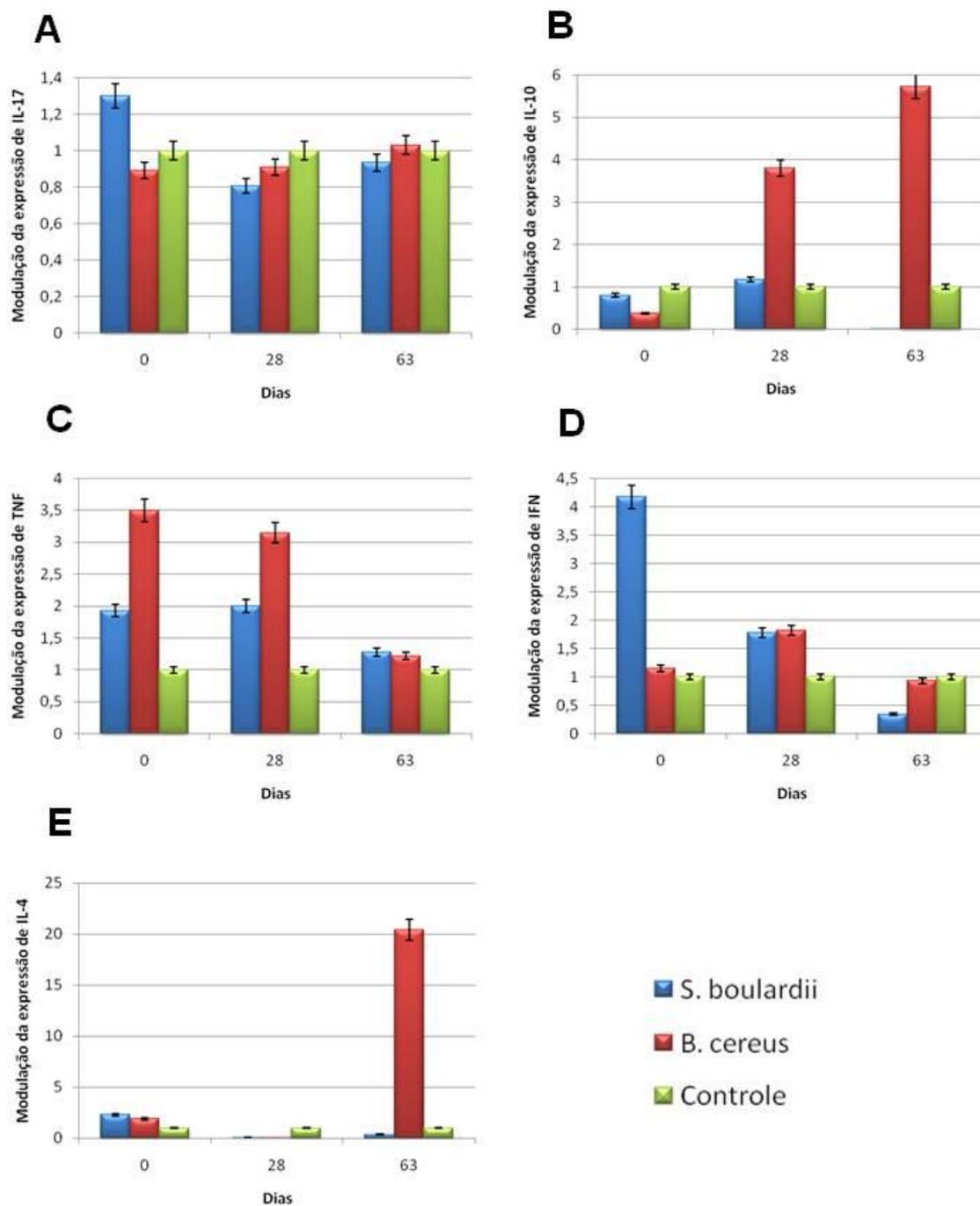


Figura 5: Modulação na expressão de citocinas produzidas por leucócitos periféricos estimulados com BoHV-5 nos dias 0, 28 e 63 do experimento, nos animais suplementados com *B. cereus* var. Toyoi, controle e suplementados com *S. boulardii*. (A) IL-17; (B) TNF; (C) IL-10; (D) IFN- γ (E) IL-4.

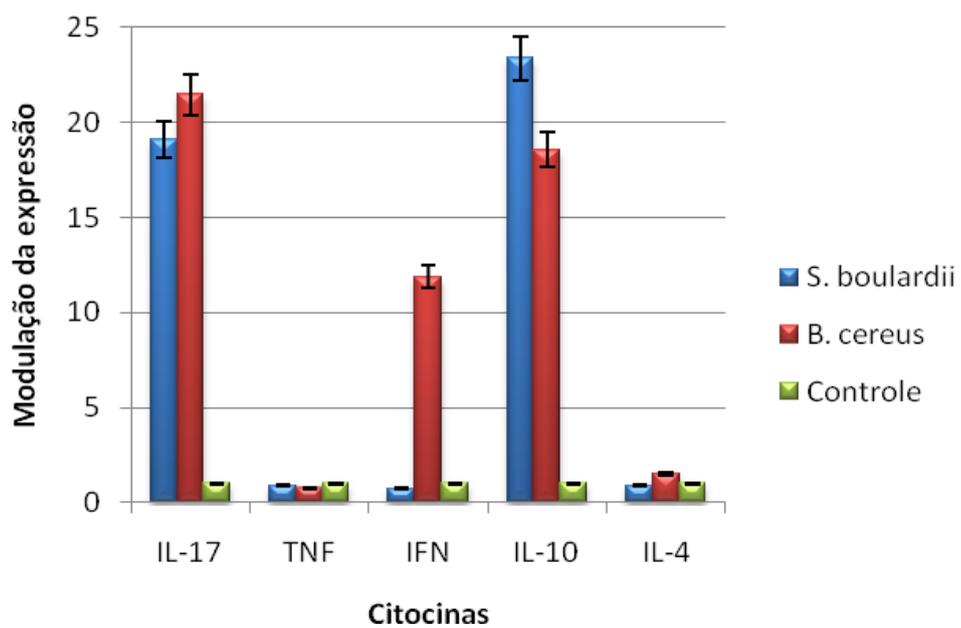


Figura 6: Modulação na expressão de citocinas produzidas em esplenócitos estimulados com BoHV-5, no dia 63 do experimento. Animais suplementados com *B. cereus* var. Toyoi, controle e suplementados com *S. boulardii*.

4. Discussão

Ambos probióticos apresentaram efeito imunomodulador, concordando com os resultados obtidos em outras espécies e com outros microrganismos probióticos (AVILA et al, 1998, YASUI et al, 1999, PERDIGON et al, 1991). Observamos uma maior resposta imune humoral nos animais suplementados, independente do probiótico utilizado quando comparado ao grupo controle. Os resultados observados apresentaram a mesma tendência no método de ELISA e na técnica de soroneutralização. Estes resultados confirmam o potencial imunomodulador do *B. cereus* e *S. boulardii* quando utilizado como suplemento na alimentação animal.

O método de ELISA tem sido amplamente empregado para pesquisa de anticorpos, é um método quantitativo que apresenta alta sensibilidade. A soroneutralização é uma técnica que apresenta maior especificidade sendo mais representativa, pois os anticorpos neutralizantes possuem maior afinidade contra o antígeno utilizado, sendo esta considerada a técnica padrão para o diagnóstico de BoHV-5. (ROITT et al., 1989)

Observamos que o *B. cereus* demonstrou ser mais eficiente na imunomodulação da resposta vacinal. Este efeito foi observado tanto quando comparado ao grupo controle, ou quando comparado ao grupo suplementado com *S. boulardii*. O efeito modulador observado pelo *B. cereus* sugere que este induz uma modulação mais para respostas tipo Th1. Este efeito pode ser demonstrado através do padrão de citocinas (IFN- γ e TNF). Os dados corroboram com os resultados obtidos por ROOS et al. (2009) demonstrando similar tendência da resposta humoral obtida em ovinos suplementados com os mesmos probióticos, bem como os dados obtidos em camundongos.

Animais suplementados com *B. cereus* apresentaram uma maior expressão de TNF e IFN- γ durante o período de suplementação, e os níveis de expressão destas citocinas retornaram a níveis similares aos observados no grupo controle após a sua interrupção. Essas observações sugerem que essa maior expressão foi mediada pelo probiótico, entretanto o mecanismo dessa modulação não tenha sido estudado. Há evidências que sugerem que as células dendríticas presentes na mucosa entérica exerçam papel fundamental

nesta modulação (SHANAHAN, 2004). Essas citocinas são produzidas pelas células com fenótipo Th1, caracterizando uma resposta celular, resposta essa favorável no controle de infecções víricas. Quanto ao papel dessas citocinas na modulação do isotipo de IgG podemos inferir que mecanismo semelhante ao observado nos experimentos com camudongos possa ocorrer, uma vez que o isotipo IgG2a observado caracteriza uma resposta celular.

O efeito modulador do *B. cereus* pode ser avaliado também nos resultados de expressão das citocinas IL-4 e IL-17. Observamos que durante o período de suplementação a expressão da IL-4 foi mantida a baixos níveis, porem quando interrompida sua administração essa foi expressa a níveis bem superiores ao período de suplementação. Essas observações colaboram com os resultados observados na expressão de INF- γ uma vez que essas citocinas possuem efeito opostos (MOSER & MURPHY, 2000).

Com relação a IL-17 observamos que no grupo suplementado com *B. cereus* houve uma expressão inferior ao grupo controle e essa diferença foi observada somente durante o período de suplementação. IL-17 é uma citocina com potencial inflamatório, tem sido observada em grandes quantidades nas doenças que acometem o sistema imune (KAIKO et al., 2007). TANABE et al., (2008) observou que a suplementação com *Bifidobacterium infantis* suprimiu a produção de IL-17 enquanto aumentou a produção de IL-10 foi aumentada, demonstrando assim o efeito dos probióticos na resposta inflamatória.

A IL-10 apresentou aumento contínuo em sua expressão, mesmo após a suspensão da administração do *B. cereus*, demonstrando o efeito imunorregulador na resposta imune conforme descrito por NIELSEN et al. (2005). A partir dos dados observamos que a expressão desta citocina pode ter sido modulada no primeiro contato com o antígeno se mantendo após a suspensão da administração dos probióticos. Ainda podemos sugerir que o aumento na sua expressão após a interrupção do fornecimento do probiótico possa ser efeito da expressão de INF- γ mediada pelo probiótico, já que essas citocinas possuem efeitos antagônicos (ROITT et al, 1989). A IL-10 é uma citocina com importante papel na regulação da resposta imune (VAARALA, 2003), e também está relacionada com a imunidade humoral, estimulando à proliferação de leucócitos B e conseqüentemente a produção de anticorpos (MATSUZAKI &

CHIN, 2000). Estas observações concordam com os resultados da soroconversão e soroneutralização observados nesse estudo.

Quando estudada expressão das citocinas nos animais suplementados com *S. boulardii*, observamos que a modulação na resposta imune não ocorre da mesma forma que o observado com o *B. cereus*. Esta observação é compreensível, pois são microrganismos diferentes que apresentam estruturas distintas, podendo apresentar diferentes mecanismos na modulação da resposta imune (HART et al., 2004; VINDEROLA et al., 2004).

Estudando a expressão de TNF e IFN- γ nos leucócitos periféricos, observamos que a expressão dessas citocinas foi superior no grupo suplementado quando comparadas ao grupo controle. E esses níveis de expressão diminuíram após a interrupção do fornecimento do probiótico, esse fato foi mais significativo com relação IFN- γ sendo seu nível de expressão inferior ao grupo controle. Esses resultados sugerem que a modulação na expressão dessas citocinas tenha sido mediada pelo *S. boulardii*. O papel modulador do *S. boulardii* em relação ao do IFN- γ pode ser também evidenciado quando se observa os resultados de expressão da IL-4. A expressão de IL-4 foi evidenciada no dia zero e significativamente reduzida no dia 28, voltando a subir no dia 63, sugerindo que o efeito antagonista do IFN- γ tenha modulado a expressão de IL-4.

Quando avaliamos a expressão da IL-10 observamos que houve uma diferença no dia 28 comparando ao controle. Entretanto o efeito modulatório fica evidente no dia 63 onde o estímulo do probiótico não estava presente e a expressão de IL-10 ficou a níveis quase não detectáveis.

Ao estudarmos a expressão da citocina IL-17 observamos uma baixa expressão comparando com os dados obtidos com o *B. cereus*. Entretanto, observamos uma diminuição de expressão no dia 28, podemos sugerir que possa ocorrer mecanismo antagônico semelhante ao observado no IFN- γ pela IL-4 (MOSER & MURPHY, 2000). Como observamos neste mesmo dia (28) um aumento da expressão de IL-10 podemos sugerir que esta também possua um efeito modulador sobre as citocinas IL-17 e IL-4. Essas observações sugerem que os resultados de soroconversão e soroneutralização observados no grupo suplementado com *S. boulardii*, tenham sido influenciados pelas citocinas IFN- γ , TNF e IL-10.

Quando avaliado os resultados obtidos na expressão das citocinas estudadas nos esplenócitos dos animais que receberam suplementação probiótica, e considerando a limitação dos dados, que são somente do dia 63 e de um só animal por grupo, podemos sugerir que pelos níveis de expressão as citocinas IL-17, IFN- γ e IL-10 estão envolvidas nos mecanismos de modulação dos probióticos testado.

Analisando os dados em conjunto obtido pela expressão dessas citocinas, em leucócitos periféricos e esplenócitos, podemos sugerir que houve envolvimento destas já na primo sensibilização vacinal. Este efeito modulador em favor dos probióticos fica evidenciado nas técnicas sorológicas.

Observamos que os probióticos *B. cereus var Toyoi* e *S. boulardii* foram capazes de modular a resposta imune em ovinos vacinados com uma vacina de BoHV-5. Esse efeito modulatório foi evidenciado na resposta vacinal, que observamos uma resposta superior nos grupos suplementados comparado aos controles. Estes dados são semelhantes aos obtidos em camundongos sugerindo que os possíveis fatores probióticos imunomoduladores exerçam seu papel de maneira semelhante nestas duas espécies.

DISCUSSÃO GERAL

Observamos que a suplementação com probióticos foi capaz de aumentar a resposta imune vacinal em todos os animais, independente do probiótico utilizado. Esta observação corrobora com outros estudos (AVILA et al, 1998, YASUI et al, 1999), porém nenhum relata o efeito imunomodulador de *Bacillus cereus* var. Toyoi. ou *Saccharomyces boulardii*.

Observamos esse efeito imunológico, mesmo após a suspensão dos probióticos. Estes resultados são muito importantes porque, em geral, para observar o efeito dos probiótico este deve ser administrado continuamente (VAUGHAN et al., 1999). O título de anticorpos foi superior nos grupos suplementados ($p < 0,05$) após a terceira vacinação, mesmo sendo após a interrupção da administração do probiótico, esses dados sugerem que o efeito imunológico ocorre durante a primossensibilização com o antígeno vacinal. Como a resposta secundária foi mais eficiente podemos sugerir que houve uma modulação durante a resposta primária estimulando mais células de memória (KAUFMANN, 2007). Esses dados ocorreram independente do probiótico e nas duas espécies animais estudadas.

O aumento da taxa IgG2a/IgG1 nos camundongos suplementados com *B. cereus* corresponde a um desvio da resposta tipo Th2 para resposta tipo Th1 (LI, 2007). Esses dados concordam com o perfil de citocinas estimulados pelo *B. cereus* var Toyoi, já que observamos o incremento da expressão de citocinas tais como IL-12 e IFN- γ no grupo suplementado. Quando comparado estes dados com os dos animais suplementados com *S. boulardii*, estes também apresentaram uma tendência para IgG2a (Th1), porém não apresentaram aumento na expressão das mesmas citocinas, sugerindo que elementos distintos, aos induzidos por *B. cereus*, estariam envolvidos na modulação para uma resposta com perfil Th1 nos animais suplementados com *S. boulardii*.

Além de modular a resposta humoral, o uso de probióticos também foi capaz de modular a resposta celular, aumentando expressão de IFN- γ , IL-12 e IL-10 nos animais suplementados. BORRUEL et al. (2002), identificaram que probióticos foram capazes de influenciar a produção de citocinas por

esplenócitos, leucócitos e células intestinais, tanto *in vitro* como *ex vivo*, o que corrobora com nossos dados.

Tais mudanças nos padrões de citocinas apóiam-se na hipótese de que os probióticos podem influenciar de forma consistente níveis de expressão de citocinas, como mostrado em ocasiões anteriores sob condições *in vitro* e *in vivo*, pelo estímulo inicial nas células dendríticas (HALLER et al, 2000; ULISSE et al., 2001; SCHULTZ et al., 2004). No entanto, a capacidade de modular o sistema imunológico quanto a expressão de citocinas é dependente do microrganismo utilizado, concentração, período de administração (HART et al., 2004; VINDEROLA et al., 2004). Os dados obtidos nesse estudo sugerem o uso promissor de probióticos para o aumento da eficácia de vacinas utilizadas em animais.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados observados nos permitem concluir que o *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Saccharomyces boulardii* possuem efeito modulador na resposta imune vacinal. Os animais suplementados apresentaram soroconversão significativamente superior ao controle, mesmo após a suspensão dos probióticos, sugerindo que seu efeito ocorreu na primosensibilização. Os resultados aqui apresentados, tanto para mono ou poligástricos, através da demonstração da expressão de citocinas bem como da produção de anticorpos contribuem para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na modulação imunológica mediada por probióticos.

A administração de probióticos contribui para eficácia das vacinas, especialmente aquelas que dependem da resposta imune celular protetora como resposta. A partir do conhecimento do mecanismo de cada probiótico, poderemos selecionar microrganismos capazes de modular para ampliação resposta humoral assim como da resposta celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMROUCHE, T.; BOUTIN, Y.; PRIOULT, G. and FLISS, I. Effects of bifidobacterial cytoplasm, cell wall and exopolysaccharide on mouse lymphocyte proliferation and cytokine production. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 70-80, 2006.

ANTUNOVIC, Z. et al. 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.

ÁVILA, F. A. et al. Use of vaccine and probiotic in the control of swine diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 50, p. 505- 511, 1998.

ÁVILA, F. A. et al. Avaliação da eficiência de um probiótico no controle de diarréia e no ganho de peso de bezerros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, p. 41-46, 2000.

BABIUK, L. A.; ROUSE, B. T. Herpesvirus vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 21, p. 63-76, 1996.

BAZIN, H. A brief history of the prevention of infectious diseases by immunizations. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.26, p.293-308, 2003.

BLOM, A.G., HILGERS, L.A. The sucrose fatty acid sulphate esters as novel vaccine adjuvants: effect of the chemical composition. **Vaccine**, v.23, p.743-754, 2004.

BORRUEL, N.; CAROL, M.; CASELLAS, F.; et al. Increased mucosal tumor necrosis factor alpha production in Crohn's disease can be down regulated ex vivo by probiótico bacteria. **Gut**, v. 51, p. 659-664, 2002.

BRADLEY, L. M.; HARBERTSON, J.; FRESCHI, G. C.; KONDRACK, R and LINTON, P. J. Regulation of development and function of memory CD4 subsets. **Immunology Research**, v. 21, p. 149-158, 2000.

BRASHEARS, M. M. et al. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and performance by feedlot cattle given *Lactobacillus* direct-fed microbials. **Journal of Food Protection**, v.66, p. 748–754, 2003.

BUDHIA, S.; HARING, L. F.; McCONNELL, I. and BLACKLAWS, B. A. Quantification of ovine cytokine mRNA by real-time RT-PCR. *Journal Immunological Methods*, v. 309, p. 160-172, 2006.

BUTS, J. P.; et al. Stimulation of secretory IgA and secretory component of immunoglobulins in small intestine of rats treated with *Saccharomyces boulardii*. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 35, p. 251-256, 1990.

CASCIO, K. E.; BELKNAP, E. B.; SCHULTHEISS, P. C.; AMES, A. D.; COLLINS, J. K. Encephalitis induced by Bovine Herpesvirus 5 and protection by prior vaccination of infection with Bovine Herpesvirus 1. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 134-139, 1999.

CASTEX, F.; CORTHER, G.; JOUVERT, S.; ELMER, G. W.; LUCAS, F. and BASTIDE, M. Prevention of *Clostridium difficile*-induced experimental pseudomembranous colitis by *Saccharomyces boulardii*: a scanning electron microscopic and microbiological study. **Journal G. Microbiology**, v. 36, p. 1085-1089, 1990.

CEZAR, M. F.; SOUZA, B. B.; SOUZA, W. H.; FILHO, E. C. P., TAVARES, G. P.; MEDEIROS, G. X. Avaliação de parâmetros fisiológicos de ovinos Dorper, Santa Inês e seus mestiços perante condições climáticas do trópico semi-árido nordestino. **Ciência Agrotécnica de Lavras**, v. 28, n. 3, p. 614-620, 2004.

COPPOLA, M. M. & GIL-TURNES, C. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, 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.

CORTHIER, G.; DUBOS, F. and DUCLUZEAU, R. Prevention of *Clostridium difficile* induced mortality in gnotobiotic mice by *Saccharomyces boulardii*. **Can. Journal Microbiology**, v. 32, p. 894-896, 1986.

CROWTHER, J.R. *Methods in Molecular Biology: The ELISA Guidebook*, v. 149, 421p. 2001.

CUMMINGS, J. H. ET AL. Passclaim – Gut Health and immunity. **Eur Journal Nutrition**, supplement 2, v. 43 p. 118-173, 2004.

DELHON, G., MORAES, M.P., LU, Z., AFONSO, C.L., FLORES, E.F., WEIBLEN, R., KUTISH, G.F., ROCK, D.L. Genome of Bovine Herpesvirus 5. **Journal Virol.**, v. 77, p. 10339-10347, 2003.

DEMANA, P.H., DAVIES, N.M., HOOK, S., RADES, T. Quil A-lipid powder formulations releasing ISCOMs and related colloidal structures upon hydration. **Journal Control Release**, v. 103, p.45–59, 2005.

DE PETRINO, S. F. et al. Protective ability of certain lactic acid bacteria against an infection with *Candida albicans* in a mouse immunosuppression model by corticoid. **Food and Agricultural Immunology**, v. 7, p. 365-373, 1995.

DIEL, D. G.; FONSECA, E. T. da; SOUZA, S. F. de; MAZZANTI, A.; BAUERMAN, F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. O Herpesvírus Bovino tipo 5 (BoHV-5) pode utilizar as rotas olfatória ou trigeminal para invadir o sistema nervoso central de coelhos, dependendo da via de inoculação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 164-170, 2005.

DOYLE, M. E. Alternatives to antibiotic use for growth promotion in animal husbandry. Food Research Intitute Briefings, University of Wisconsin, p.1-17, 2001.

DUMMER L. A. et al. Cloning and expression of a truncated form of envelope glycoprotein D of Bovine herpesvirus type 5 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods**, v. 161 p. 84-90, 2009.

ERICKSON, L. K.; HUBBARD, E. N. Probiotic immunomodulation in health and disease. **Journal of Nutrition**, 130, p. 403-109, 2000.

FRENCH, E.L. Relationship between infectious rhinotracheitis (IBR) virus and a 5 virus isolated from calves with encephalitis. **Australian Vet. Journal**, v. 38, p.555-556, 1962.

GALDEANO, C. M. & PERDIGÓN, G. Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 673-681, 2004.

GIL de los SANTOS, J. R. **Efeito de probióticos na translocação de Salmonella enteretides e na eficiência alimentar de frangos de corte**. 2004. 80 f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

GIL-TURNES, C. et al. Properties of the *Bacillus cereus* strain used in probiotic CenBiot. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 11-14, 1999.

GOMES, A. M. P.; MALCAT, F.X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos e aplicações tecnológicas. **Biotecnologia alimentar, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa**, p.12-22 Disponível em: http://deqb.ist.utl.pt/bbio/64/pdf/agentes_probioticos_em_alimentos.pdf Acesso em: 28 out de 2009.

GOMEZ-ALARCON, R. A.; DUDAS, C.; HUBER, J. T. Influence of cultures of *Aspergillus oryzae* on rumen and total tract digestibility of dietary components. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 703, 1990.

GOMEZ-ALARCON, R. A.; HUBER, J. T.; HIGGIN-BOTHAM, F. W.; AMMON, D.; TAYLOR, B. Influence of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the milk-yields, eating patterns, and body temperatures of lactating cows. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 1733, 1991.

GUILLOT, J. F. Les probiotiques en alimentation animale. **Cahiers d'Agriculture**, v. 7, p. 49-54, 1998.

HALLER D, BLUM S, BODE C, HAMMES WP, SCHIFFRIN EJ. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leukocyte co-cultures. **Gut**; v.47, p.79–87, 2000.

HALLER, D. & JOBIN C. Interaction between resident luminal bacteria and host: can a healthy relationship turn sour? **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.38, p. 123-136, 2004.

HART AL, LAMMERS K, BRIGIDI P, VITALI B, RIZZELLO F, GIONCHETTI P, et al. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. **Gut**, v. 53, p, 1602-1609, 2004.

HESSLE, C.; ANDERSSON, B. and WOLD, A. E. Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while Gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production. **Infection and Immunology**, june, p. 3581-3586, 2000.

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

HONG, H. A.; et al. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 813 – 835, 2005.

HORI T, KIYOSHIMA J, YASUI H. Effect of an oral administration of *Lactobacillus casei* strain Shirota on the natural killer activity of blood mononuclear cells in aged mice. **Biosci Biotechnol Biochem**, 67:420–2; 2003.

HUANG, D.B., WU, J.J., TYRING, S.K. A review of licensed viral vaccines, some of their safety concerns, and the advances in the development of investigational viral vaccines. **Journal of Infection**. V. 49, p.179–209, 2004.

IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal, 2007.

JONES, C.; CHOWDHURY, S. A review of the biology of Bovine Herpesvirus type 1, its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 2, p. 187-205, 2008. MAYR A.; BACHMANN P.A.; WITHMANN G. Virologische Arbeitsmethoden – Band IV - Sicherheit bei virologischen arbeiten - Biometrische Methoden. Stuttgart : **Gustav Fischer Verlag**, 1982.

KAIKO, G. E.; HORVAT, J. C.; BEAGLEY, K. W. and HANSBRO, P. M. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? **Immunology**, v. 123, p. 326-338, 2007.

KATO, I. et al. Augmentation of mouse natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* and its surface antigens. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v.28, n.2, p.209-217, 1984.

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

KELLEMS, R. O.; LAGERSTEDT, A.; WALLENTINE, M. V. Effect of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation extract or *Aspergillus oryzae* plus yeast culture plus mineral and vitamin supplement on performance of Holstein cows during a complete lactation. **Journal of Dairy Science**. v. 73, p. 2922, 1990.

KREHBIEL, C. R.; et al. 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. et al. 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.

LARSSON, B.M.; LARSSON, K.; MLMBERG, P. and PALMBERG, L. Gram positive bacteria induce IL-6 and IL-8 production in human alveolar macrophages and epithelial cells. **Inflammation**, v. 23, p. 217-230, 1999.

LEMA, M. et al. Reduction of fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 in lambs by feeding microbial feed supplement. **Small Ruminant Research**, v.39, p. 31–39, 2001.

LEVINGS, M. K. & RONCAROLO, M. G. T-regulatory 1 cells: a novel subset of CD4 T cells with immunoregulatory properties. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 106, p. 109-112, 2000.

LI, H.; NOOKALA, S. and RE, F. Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1 β and IL-18 release. **The Journal of Immunology**, v. 178, p. 271-276, 2007.

MacDONALD, T.T. & MONTELEONE, G. Immunity, Inflammation and Allergy in the gut. **Science**, v. 307, p. 1920-1925, 2005.

MATSUZAKI, T.; CHIN, J. Modulating immune responses with probiotic bacteria. **Immunology and Cell Biology**, v.78, p. 67-73, 2000.

McNEELA, E. A. & MILLS, K. H. G. Manipulating the immune system: humoral versus cell-mediated immunity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 51, p. 43-54, 2001.

McKENNA, K.; BEIGON, A. S. and BHARDWAJ, N. MINIREVIEW Plasmacytoid dendritic cells: Linking Innate and Adaptive Immunity, **Journal of Virology**, jan., p. 17-27, 2005.

MIKEL, A.; TASENDE, C.; SOSA, C. ; GARÓFALO, E. G. The role of sex steroid receptors in sheep female reproductive physiology. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 385-394, 2004.

MOSER, M. & MURPHY, K. M. Dendritic cell regulation of Th1-Th2 development. **Nature Immunology**, v. 1, p. 199-205, 2000.

NAKAMURA, T.; KAMOGAWA, Y.; BOTTOMLY, K. and FLAVELL, R. A. Polarization of IL-4 and IFN- γ producing CD4⁺ T cell. **Journal Immunology**, v. 158, p. 1085-1094, 1997.

NICOLI, J. R.; VIEIRA, L.Q. Prebióticos e Probióticos, **Ciência Hoje**, v.28, n. 163, p.34-38, 2000.

NIERS, L. E. M.; TIMMERMAN, H. M.; RIJKERS, G. T. et al., Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which down-regulate T helper type 2 cytokines. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 35, p. 1481-1489, 2005.

NOGUEIRA, E. A.; NOGUEIRA JÚNIOR, S. Ovinos e Caprinos avançam em São Paulo. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/OUT/verTexto.php?codTexto=4136> Acesso em: 05 de novembro de 2006.

O'GARRA, A. & ARAI, N. The molecular basis of T helper 1 and 2 cell differentiation. **Trends Cell Biology**, v. 10, p. 542-550, 2000.

OGAWA, T.; ASAI, Y.; TAMAI, R.; MAKIMURA, Y.; SAKAMOTO, H.; HASHIKAWA, S. and YASUDA, K. Natural killer cell activities of symbiotic *Lactobacillus casei* ssp. Casei in conjunction with dextran. **Clinical and Experimental Immunology**, nº 143: p. 103–109, 2005.

PERRIE, Y.; MOHAMMED, A. R.; KIRBY, D. J.; MCNEIL, S. E. and BRAMWELL, V. W. Review: Vaccine adjuvant systems: Enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, p. 272–280, 2008.

PERDIGÓN, G.; ALVAREZ, S. and PESCE DE RUIZ HOLGADO A. A.. Oral immunoadjuvant activity of *Lactobacillus casei* influence of dose the secretory immune response protective capacity in intestinal infections. **Journal Dairy Research**, v. 58, p. 485-496, 1991.

PERDIGÓN, G.; ALVAREZ, S. Probiotics and the immune state. In: FULLER, R., ed. **Probiotics: the scientific basis**. London: Chapman and Hall, p.145-180, 1992.

PERDIGÓN, G.; VINTINI, E.; ALVAREZ, S.; MEDINA, M. and MEDICI, M. Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. **Journal Dairy Science**, v. 82, p. 1108-1114, 1999.

PINTO, R. A.; ARREDONDO, S. M.; GAGGERO, A. A.; DIAZ, 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.

PLOTKIN, S. A. Vaccines: Past, present and future. **Nat. Med.** v. 11, p. 5-11, 2005.

POTHOULAKIS, C.; KELLY, C. P.; JOSHI, M. A.; GAO, N.; O'KEANE, C. J. et al. *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. **Gastroenterology**, v. 104, p. 1108-1115, 1993.

ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D., **Immunology**, 2nd Ed. Gower Med. Publishing, London, 1989.

ROOS, T.B.; et al. Effect of *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Sacharomyces boulardii* on the immune response of sheep to vaccines. **Food and Agricultural Immunology**. (Aceito para publicação em 2009).

ROTH, F. X.; KIRCHGESSNER, M. Nutritive wirksamkeit von toyocerin. 2 Kalbermast. **Landwirtschaftliche-Forschung**, Frankfurt, v. 41, n. 1-2, p. 63-70, 1998.

ROIZMANN, B., DESROSIERS, R.C., FLECKENSTEIN, B., LOPEZ, C., MINSON, A.C., STUDDERT, M.J. The family Herpesviridae: an update. **Arch. Virol.** , v. 123, p. 425-449, 1992.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics: approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, 73: 2, 361S-364, 2001.

SCHULTZ M, STRAUCH UG, LINDE HJ, WATZL S, OBERMAIER F, GOTTL C, et al. Preventive effects of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute and

chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis. **Clinical Diagn Lab Immunology**, v.11, p. 372-378, 2004.

SEDER, R. A. & PAUL, W. E. Acquisition of lymphokine producing phenotype by CD4+ T cells. **Annu. Rev. Immunology**, v. 12, p. 635-673, 1994.

SELAIVE-VILLARROEL, A. B.; SILVEIRA, V. C. P.; OLIVEIRA, N. M. Desenvolvimento e produção de carne de ovinos Corriedale abatidos com diferentes idades sobre pastagem natural ou artificial. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 3, n. 3, p. 111-118, 1997.

SHANAHAN, F. Probiotic and the Immune Response: how much can we expect? **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 39, p. 748-749, 2004.

SHEIL, B.; SHANAHAN, F. and O'MAHONY, L. Probiotic Effects on inflammatory Bowel Disease. **The Journal of Nutrition**, v.137, p. 819-824, 2007.

SHU, Q. et al. Probiotic treatment using *Bifidobacterium lactis* HNO19 reduces weanling diarrhea associated with rotavirus and *Escherichia coli* infection in a piglet model. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v. 33, n. 2, p. 171-177, 2001.

SINGH M, O'HAGAN DT. Recent advances in vaccine adjuvants. **Pharm Res**; v.19(6), p.715-728, 2002

SOUZA, V.F., MELO, S.V., ESTEVES, P.A., SCHMIDT, C.S., GONÇALVES, D.A., SCHAEFER, R., SILVA, T.C., ALMEIDA, R.S., VICENTINI, F., FRANCO, A.C., OLIVEIRA, E.A., SPILKI, F.R., WEIBLEN, R., FLORES, E.F., LEMOS, R.A., ALFIERI, A.A., PITUCO, E.M., ROEHE, P.M. Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesq. Vet. Bras.** v. 22, p. 13-18, 2002.

STATISTIX. Statistix for Windows User's Manual. Ed. Analytical Software. Tallahassee. Fl. 2003.

STERN, R. M.; STORRS, A. B. The rationale of *Lactobacillus acidophilus* in feeding programs for livestock. **Proc. 36th Minnesota Nutrition Confederation**, Bloomington, p.191, 1975.

TABELEÃO, Vinícius Coitinho. **Efeito da suplementação com Monensina ou Probióticos em cordeiros sobre parâmetros ruminais e metabólicos**. 2006. 55f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

TANABE, S.; KINUTA, Y. and 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.

THOMKE, S.; ELWINGER, K. Growth promotants in feeding pigs and poultry. III Alternatives to antibiotic growth promotants. **Annales de Zootechnie**, v. 4, p. 245-271, 1998.

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

ULETT GC, KETHEESAN N, HIRST RG. Cytokine gene expression in innately susceptible Balb/c mice and relatively resistant C57BL/6 mice during infection with virulent *Burkholderia pseudomallei*. **Infect Immunity**, v. 68(4), p. 2034-2042, 2000.

ULISSE S, GIONCHETTI P, D'ALO S, RUSSO FP, PESCE I, RICCI G, et al. Expression of cytokines, inducible nitricoxide synthase, and matrix metalloproteinases in pouchitis: effects of probiotic treatment. **American Journal Gastroenterology**, v. 96, p.2691–2699, 2001.

UMEMURA M, YAHAGI A, HAMADA S, BEGUM MD, WATANABE H, KAWAKAMI K, SUDA T, SUDO K, NAKAE S, IWAKURA Y et al.: IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette– Guerin infection. **Journal Immunology**, v. 178, p. 3786-3796, 2007.

VAARALA, O. Review: Immunological effects of probiotics with special reference to lactobacilli. **Clinical Exp. Allergy**, v. 33, p. 1634-1640, 2003.

VANGALA, A., KIRBY, D., ROSENKRANDS, I., AGGER, E.M., ANDERSEN, P., PERRIE, Y. A comparative study of cationic liposome and niosome-based adjuvant systems for protein subunit vaccines: characterisation, environmental scanning electron microscopy and immunisation studies in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p. 787–799, 2006.

VAUGHAN, E. E.; MOLLET, B. and deVOS W. M. Functionality of probiótico and intestinal lactobacilli: light in the intestinal tract tunnel. *Food Biotechnology*, v.10, p. 505-510, 1999.

VINDEROLA CG, MEDICI M, PERDIGÓN G. Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. **Journal Appl. Microbiology**, v. 96, p. 230-243, 2004.

VOGEL, F. S. F.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; KUNRATH, C. F. Atividade neutralizante anti-Herpesvírus Bovino tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) no soro de bovinos imunizados com vacinas contra o BHV-1. **Ciência Rural**, v, 32, n. 5, p. 881-14 883, 2002.

YASUI, H. et al. Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, Dordrecht, v. 76, n. 1, p. 383-389, 1999.

WHETSTONE, C.A., SEAL, B.S., MILLER, J.M. Variability occurs in the inverted repeat region of genomic DNA from Bovine Herpesvirus 1 respiratory, genital and Bovine Herpesvirus 5 encephalitis isolates. **Vet. Microbiol.**, v. 38, p. 181-189, 1993.

WIEDMEIER, R. D., ARAMBEL, M. J.; WALTERS, J. L. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 2063, 1987.

