

## EFEITO IMUNOMODULADOR DO *BACILLUS TOYONENSIS* EM EQUINOS VACINADOS CONTRA O TÉTANO

MAYARA CAETANO ABREU<sup>1</sup>; NEIDA LUCIA CONRAD<sup>2</sup>, RENAN ARAÚJO  
PIRAINE<sup>3</sup>, FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária -  
[mayaraabreu@live.com](mailto:mayaraabreu@live.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia -  
[conradneida@gmail.com](mailto:conradneida@gmail.com); <sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas Programa de Pós Graduação em  
Biotecnologia - [renanbiotec@gmail.com](mailto:renanbiotec@gmail.com); <sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – Programa de Pós  
Graduação em Biotecnologia / Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária  
[fleivasleite@gmail.com](mailto:fleivasleite@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o rebanho equino supera os 5.75 milhões de cabeças e a equideocultura movimenta anualmente R\$ 16.15 bilhões, gerando 3 milhões de empregos diretos e indiretos, demonstrando a importância econômica desta espécie no país (IBGE, 2019). A classe terapêutica de maior destaque no mercado veterinário é dos insumos biológicos, destacando a importância das vacinas, representando 28% do mercado veterinário brasileiro (FIALHO, 2014).

As vacinas tem sido uma importante medida de profilaxia e controle das doenças infecciosas (POLLARD e BIJKER, 2021). Neste contexto, as vacinas recombinantes vêm se destacando como uma alternativa promissora devido a utilização de antígeno de alta qualidade e por serem seguras (MOREIRA et al., 2018). Como desvantagem, elas são menos imunogênicas, por isso, se buscam alternativas para ampliar essa resposta, como o uso de adjuvantes, estratégias vacinais e probióticos (HUANG, et al., 2004).

Probióticos são microrganismos vivos que administrados em doses adequadas aos animais e/ou humanos conseguem trazer benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Diversos microrganismos apresentam efeito probiótico (SANCHEZ et al., 2015) dentre eles destaca-se o *Bacillus toyonensis*. *B. toyonensis* é uma bactéria Gram positiva, que esporula, não patogênica e tem sido utilizada nas últimas décadas como probiótico na suplementação animal (GILTURNES e CONCEIÇÃO, 2007). A administração de *B. toyonensis* induz efeitos imunomoduladores com a capacidade de aumentar a eficácia das vacinas em ovelhas SANTOS et al., 2018), camundongos (ROOS et al., 2010), cães (FRANZ et al., 2021).

*Clostridium tetani* possui distribuição mundial (POPOFF, MICHEL, 2020), afetando todos os mamíferos, sendo a espécie equina de maior sensibilidade (HÉLÈNE, AMORY, 2011). A vacinação anual contra o tétano é recomendada já que os índices de letalidade são próximos à 75% (MAGALHÃES, et al., 2016). *C. tetani* possui 10 sorotipos e produz 3 toxinas, sendo a tetanoespasmina e a neurotoxina de importância clínica (HÉLÈNE, AMORY, 2011). As vacinas contra o tétano disponíveis comercialmente são produzidas através da inativação com formaldeído da toxina tetânica, tal elaboração gera riscos de biossegurança e um laborioso processo de inativação (FERREIRA et al., 2016). Visando minimizar tais riscos dos métodos tradicionais, os antígenos recombinantes vêm sendo pesquisados como alternativa (MOREIRA et al., 2018).

Este estudo objetiva avaliar a modulação da resposta imunológica em equinos suplementados com o probiótico *B. toyonensis* vacinados com vacina recombinante contra a toxina de *Clostridium tetani*.

## 2. METODOLOGIA

Para a produção do probiótico a cepa de *B. toyonensis* (BCT-7112) foi recuperada do acervo de microrganismos do laboratório de Microbiologia, no Centro de Biotecnologia UFPel e cultivada em meio BHI ágar (Brain Heart Infusion), pelo período de 24h de incubação à 37 °C. Posteriormente, 1-2 colônias foram selecionados e inoculadas em um Erlenmeyer contendo 50 ml de BHI, pelo período de 24h no agitador orbital (150 rpm) à 37 °C. Após certificação da pureza do cultivo (técnica de Gram) este foi inoculado em 500ml de meio NYSM (5g peptona, 5g extrato de carne, 1g extrato de levedura e 1g sais em qsp 500 ml água destilada), e incubado conforme condições já descritas, pelo período de 120h. Logo após, o cultivo foi centrifugado, e o pellet suspenso em solução salina e submetido a tratamento térmico à 86 °C por 15 min.. Posteriormente, foi observada a presença de esporulação através de microscopia e coloração de Wirtz-Conklin (SCHAEFFER E MACDONALD, 1993). Células de *B. toyonensis* foram quantificadas através de diluições seriadas do cultivo e semeadas em placas de BHI (triplicata), incubadas (37 °C, 24h) seguido da contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) por placa.

A quantidade diária do probiótico fornecido aos cavalos foi de  $4 \times 10^9$  UFC de *B. toyonensis* adicionado ao melaço (ALIMEL- Supra®- Lote158613, pH ~6,0) na proporção de 3:1. A solução probiótico-melado (40 ml) foi adicionado a 500 g de ração comercial e ofertado individualmente aos animais. A bacterina recombinante contra o tétano, produzida em *E. coli* e adsorvidas em Hidróxido de Alumínio utilizada neste estudo, foi cedida pelo laboratório de Imunologia CDTec/UFPel, produzidas conforme protocolo descrito por MOREIRA JR et.al. (2018).

Foram utilizados 20 equinos adultos hípidos que foram vacinados, via intramuscular, com a vacina recombinante contra o tétano (rTENT), contendo 400 µg/dose em 2 ml. Foram administradas 2 doses vacinais, com intervalo de 21 dias entre elas (dias 0 e 21 do experimento). Os cavalos foram divididos em 2 grupos, contendo 10 animais em cada: grupo 1. suplementados diariamente com *B. toyonensis*; grupo 2, controle, recebeu apenas o melado com solução salina (40 ml/dia). Os animais foram suplementados por 42 dias de forma contínua, iniciando 7 dias antes da 1ª dose vacinal e seguindo até o dia 35 do experimento. Foram coletadas amostras de sangue por venopunção da jugular nos dias 0, 14, 28, 42, 64 e 84 para obtenção de soro e avaliação da resposta imune humoral.

A avaliação da resposta humoral dos níveis de IgG totais foi realizado através do ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. Brevemente, placas de poliestireno com 96 cavidades que foram sensibilizadas com 200ng/cavidade de rTENT diluído em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) incubados overnight, à 37°C. As amostras de soro foram diluídas 1:100 em solução leite em pó desnatado diluído em solução salina fosfatada (PBS, pH 7,6). Posteriormente, foi adicionado o anticorpo anti-horse conjugado com peroxidase, diluído 1:4000 em PBS. Entre cada uma das etapas as placas foram incubadas por 1h à 37°C e submetidas a lavagem com PBS-Tween 20. Para visualizar as reações foi adicionado substrato cromógeno (0,004 mg de OrtoPhenilenoDiamina-OPD, 15µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 ml de tampão fosfato citrato pH 4,0). Após período de incubação (15 min) a temperatura ambiente e ausência de luz foi utilizado solução de ácido sulfúrico à 3% para parar a reação do cromógeno. Após, as absorbâncias foram aferidas em um leitor de microplacas TP-Reader8 a 492 nm. A isotipagem foi realizada utilizando o protocolo descrito por VIANNA

et al., 2014. Brevemente, os anti-isotipos (BIO-RAD) para IgG1 e IgG4-7 foram diluídos em PBS 1:2000, enquanto que o IgG3-5 foi diluído 1:5000 em PBS.

A avaliação estatística foi realizada com o GraphPad Prism v7. Utilizando t-test e One-Way ANOVA seguido por Turkey para testes de comparação múltiplas.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No grupo suplementado foram detectados anticorpos específicos após a primeira dose vacinal, no dia 21 do experimento ( $p < 0,005$ ), enquanto que no grupo não suplementado foi observada resposta contra rTENT apenas após a segunda dose vacinal, no dia 35 do experimento (Figura 1). Este dado sugere que a suplementação probiótica com o *B. toyonensis* modulou a resposta humoral, gerando anticorpos específicos contra o rTENT após a primovacinação. A resposta após a primovacinação também foi observada em ovelhas suplementadas por 5 dias com *B. toyonensis* previamente à vacinação com bacterina comercial contra o *Clostridium chauvoei*, obtendo o aumento de anticorpos específicos antitoxina (SANTOS et al., 2021). Sugerindo novamente a influência da suplementação probiótica na resposta à vacina.



**FIGURA 1. Avaliação de anticorpos específicos anti-rTENT através de ELISA indireto.** As colunas representam as médias individuais de anticorpos específicos contra o rTENT durante o período experimental. Onde a letra "a" representa diferença estatística ( $P < 0,05$ ) comparando ao dia 0 do respectivo grupo e o asterisco (\*) simboliza a diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre os grupos suplementado e não suplementado.

Alguns estudos sugerem que a suplementação probiótica em equinos pode acarretar em disbiose, como o trabalho que testou a suplementação em neonatos equinos com *B. toyonensis*, com a finalidade de diminuir as diarreias transitórias comuns nesta faixa etária, não foi observado diferenças entre os grupos avaliados, e ainda uma tendência a diarreias mais intensas no grupo suplementado (JOHN et al., 2015). Na suplementação contínua por 42 dias testadas no presente experimento, não foi observado nenhum efeito adverso.

A diferença estatística nos níveis totais de anticorpos específicos contra rTENT foi de 2,25 vezes mais do que no grupo controle. A maior diferença observada na dinâmica da avaliação de anticorpos IgG totais específicos contra o rTENT foi no dia 35 no grupo suplementado, e no dia 42 no grupo não suplementado.

Na caracterização da resposta IgG foram detectados os isotipos IgGa/1, IgGb 4/7 e IgG (T) 3/5. O nível de IgGa foi superior no grupo suplementado, avaliado no dia 42 do experimento. Na isotipagem de IgGb não foi observada diferenças significativas entre os grupos, ambos responderam com o mesmo nível de anticorpos. Na avaliação dos níveis de IgG (T), foi observado diferença entre os grupos nos dias 35 e 42 ( $P < 0,05$ ), sendo maiores no grupo suplementado.

As subclasses de IgG podem ser indicadores indiretos de respostas de linfócitos T e podem indicar resposta imune direcionada para células T auxiliares tipo 1 ou células T auxiliares tipo 2 (ESTES et al., 2002). Com a finalidade de avaliar a resposta de subclasses de IgG em equinos vacinados contra vírus respiratórios bovinos foi utilizado protocolo de dexametasona, a IgG (T) não foi afetada enquanto que IgGa e IgGb se mostraram suprimidas pela administração de corticosteróides

(SLACK et al., 2000). Os isotipos IgGa e IgGb são atribuídas a capacidade de fixar complemento e mediar a citotoxicidade celular dependente de anticorpos, a IgG (T) não tem tais características e é bem adaptada para a neutralização de toxinas como as de *Clostridium sp.* (LEWIS, et al., 2008). Logo, IgG (T) pode se sugerir que induz uma resposta com direcionamento em células T auxiliares tipo 2, ao contrário dos isotipos IgGa e IgGb que foram suprimidas pelo uso de corticosteróides que pode indicar ser dependentes de citocinas de células T auxiliares tipo 1 (SLACK et al., 2000).

Em estudo realizado com equinos vacinados contra vírus respiratórios bovinos foi observado aumento nas concentrações séricas de IgG M, IgG (T), IgGa, IgGb total específicas contra o antígeno testado (RYAN E GIGUÈRE, 2010). Assim como foi observado o aumento dessas subclasses de IgG no presente estudo. Em outro estudo realizado com equinos vacinados com vacina recombinante EMA-2 contra a theileriose equina, também observou uma aumento de imunoglobulinas totais específicas ao antígeno testado, com a subclasse IgG (T)3/5 com maior elevação do que as outras subclasses (SANTOS, et al., 2021). A IgG3 é a subclasse de maior capacidade de desencadear explosão respiratória via ligação com receptor FC (LEWIS, et al., 2008) que foi a subclasse que a suplementação probiótica mostrou maior capacidade de estimulação. Tendo ainda a maior capacidade de neutralização de toxinas, o que se busca na imunização contra o tétano.

#### 4. CONCLUSÕES

A suplementação com o *Bacillus toyonensis* foi capaz de ampliar a resposta humoral em equinos vacinados com bacterina recombinante de rTENT.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MOREIRA JR, C; FERREIRA, M.R.A; DA CUNHA, C.E.P; DONASSOLO, R.A; FINGER, P.F; MOREIRA, G.M.S.G; OTAKA, D.Y; DE SOUZA, L.A; BARBOSA, J.D; MOREIRA, A.N; SALVARANI, F.M; CONCEIÇÃO, F.R. Immunogenicity of a Bivalent Non-Purified Recombinant Vaccine against Botulism in Cattle. *Toxin*, v. 10, n. 381, 2018.
- JOHN, J.; ROEDIGER, K.; SCHROEDL, W.; ALDAHER, N.; VERVUERT, I. Development of intestinal microflora and occurrence of diarrhea in scking foals: effects of *Bacillus cereus* var. *toyoi* supplementation. *BMC Veterinary Research*. v.11, n 35, 2015.
- SANTOS, F. D. S.; MAUBRIGADES, L. R.; GOLÇALVES, V. S.; FERREIRA, M. R. A.; BRASIL, C. L.; CUNHA, R. C.; CONCEIÇÃO, F. R.; LEITE, F. P. L. L. Immunomodulatory effect of short-term supplementation with *Bacillus toyonensis* BCT-7112 and *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 in sheep vaccinated with *Clostridium chauvoei*. *Veterinary Immunopathology*, v.34, n. 237, 2021.
- SANTOS, A. C.; NOGUEIRA, C. E. W.; MORAES, B. S. S.; MÜLLER, V.; MOUSQUER, M. A.; LEITE, F. P. L. L. Immune response of adults horses, pregnant mares and foals to na experimental vaccine with recombinant EMA-2 protein of *Theileria equi*. *Researche in Veterrinary Science*. v. 139, n. 186, 2021.
- FERREIRA, M. R. A.; MOREIRA, G. M. S. G.; CUNHA, C. E. P.; MENDONÇA, M; SALVARANI, F. M.; MOREIRA, A. N.; CONCEIÇÃO, F. R. Recombinante Alpha, Beta, and Epsilon Toxins of *Clostridium perfringens*: Production Strategies and applications as Veterinary Vaccines. *Toxins*, v. 8, n. 340, 2016.
- ESTES, D. M.; BROWN, W., L. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v. 90, n.10, 2002.
- SLACK, J.; RISDAHL, J. M.; VALBERG, S. J.; MURPHY, M. J.; SCHRAM, B. R.; LUNN, P. D. Effects of dexamethasone on development of immunoglobulin G subclass responses following vaccination of horses. *AJVR*. v.61. n. 12, 2000.