

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Departamento de Microbiologia e Parasitologia
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e
Parasitologia

Tese



DESENVOLVIMENTO DE INSUMOS IMUNOBIOLÓGICOS PARA O CONTROLE
DE *Haemonchus contortus* EM OVINOS

Natália Berne Pinto

Pelotas, 2020

Natália Berne Pinto

**DESENVOLVIMENTO DE INSUMOS IMUNOBIOLOGICOS PARA O CONTROLE
DE *Haemonchus contortus* EM OVINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências com concentração de conhecimentos em Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P659d Pinto, Natália Berne

Desenvolvimento de insumos imunobiológicos para o controle de *Haemonchus contortus* em ovinos / Natália Berne Pinto ; Fábio Pereira Leivas Leite, orientador. — Pelotas, 2020.

65 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Imunomodulação. 2. Nematódeo. 3. Probiótico. 4. Ruminante.. I. Leite, Fábio Pereira Leivas, orient. II. Título.

CDD : 636.2089696

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Natália Berne Pinto

**DESENVOLVIMENTO DE INSUMOS IMUNOBIOLOGICOS PARA O CONTROLE
DE *Haemonchus contortus* EM OVINOS**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 19/02/2020

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (Orientador)
Doutor em Veterinary Sciences pela University of Wisconsin-Madison

Profa, Dra. Camila Belmonte Oliveira
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Dr^a. Micaele Quintana de Moura
Doutora em Parasitologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Felipe Geraldo Pappen
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Leandro Quintana Nizoli
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me guiar e estar ao meu lado.

À minha mãe, que é fonte inesgotável de força e amor e sempre me dá suporte com todo o apoio que preciso. Ao meu pai, meu irmão e minha avó por todo carinho e por completarem a base da minha família.

Ao meu marido, por todo amor e paciência nas horas difíceis, e por entender os momentos de abdicação do tempo juntos.

Ao meu orientador, Fábio Pereira Leivas Leite, por sempre acreditar em mim e incentivar a sempre buscar mais e o melhor profissionalmente.

Aos meus amigos e parceiros diários de laboratório, Micaele, Wesley, Leonardo, Adriane e Caroline por sempre estarem ao meu lado e dispostos a ajudar em qualquer situação. E em especial a minha comadre Gabriela que está comigo em todas as horas e que me presenteou com luz dos nossos caminhos que é a Laura.

Aos meus amigos da EMBRAPA Emanuelle, Alessandro, Robert, Rossana e Bernardo por todo apoio tanto na parte prática como teórica do experimento e pelo excelente convívio.

A todos os nossos professores do programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia da UFPel, que se empenham em nos ajudar a seguir da melhor forma nossos caminhos.

A Universidade Federal de Pelotas pela formação na graduação, mestrado e doutorado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos no Brasil e no Exterior.

Muito obrigada!!

Resumo

Pinto, Natália Berne. **Desenvolvimento de insumos imunobiológicos para o controle de *Haemonchus contortus* em ovinos**. 2020. 65f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia. Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

Desenvolver alternativas para o controle do nematódeo gastrointestinal de ruminantes, *Haemonchus contortus*, é um desafio necessário para a continuidade dos rebanhos de ovinos ao redor do mundo. O objetivo deste estudo foi avaliar efeito imunológico e nematicida dos probióticos *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii* em ovinos experimentalmente infectados com de *Haemonchus contortus*, e de verificar a imunogenicidade de peptídeos sintéticos selecionados pela análise do genoma de *H. contortus* em camundongos. Foram utilizados no primeiro estudo 18 ovinos divididos em Grupo tratamento: animais suplementados com *S. cerevisiae* e infectados com *H. contortus*, e Grupo controle: animais infectados sem suplementação. No segundo estudo, 24 ovinos divididos em grupo suplementado com *S. boulardii*, grupo controle, e grupo Naive (não infectado e não suplementado). Para os tratamentos foi utilizada 40 mL de suspensão da levedura na concentração de 1×10^7 UFC/mL, diariamente por 49 dias. Foram avaliados os parâmetros parasitológicos: número de ovos de *H. contortus* nas fezes (OPG), número de larvas infectantes (L3) recuperadas por coprocultura e a carga parasitária do abomaso. Para os parâmetros imunológicos, foram quantificados: imunoglobulinas IgA no muco e IgG sérica anti-*H. contortus*; citocinas IL-4, IL-5 e IL-10; número de eosinófilos na mucosa do abomaso e os grupos de células positivas para os marcadores: MHCII, CD4+CD25+, CD5+CD8+, WC4, CD5+CD4+ e CD5+WC1 por citometria de fluxo do sangue periférico total. Para a avaliação da imunogenicidade dos peptídeos foram utilizados 40 camundongos divididos em quatro grupos. Destes, um grupo permaneceu como controle, e os outros três foram vacinados com duas doses, no intervalo de 21 dias, da sua respectiva vacina contendo 20µg do respectivo peptídeo em 100µl de PBS e adsorvido em 10% de Al(OH)₃, por via subcutânea. Coletas de sangue individuais foram realizadas semanalmente para a avaliação, por ELISA indireto, da imunogenicidade dos peptídeos. Os resultados dos experimentos com *Saccharomyces* demonstraram diminuição significativa ($p < 0.05$) no número de larvas no grupo *S. cerevisiae* e uma redução de 48% no OPG do grupo tratado com *S. boulardii*. Em ambos os tratamentos, com *S. boulardii* e *S. cerevisiae*, foi observado níveis significativamente mais elevados de IgG sérica anti-*H. contortus* ($p < 0.05$) e de células positivas para MHCII. No grupo *S. cerevisiae* também se constatou número significativamente superior de eosinófilos ($p < 0.05$) na mucosa, bem como no número nas células CD4+CD25+, CD5+CD8+. Os três peptídeos testados se mostraram imunogênicos a partir da segunda dose. Assim, este estudo evidenciou a ação probiótica benéfica local e sistêmica de *Saccharomyces cerevisiae* e de *Saccharomyces boulardii* na resposta imune de ovinos infectados com *H. contortus*, e ação nematicida demonstrada principalmente pela redução no número de L3 e ovos recuperadas das fezes dos

ovinos suplementados. Além disso, os três peptídeos testados demonstraram ação imunogênica, sendo promissores para o desenvolvimento de uma nova vacina para o controle da hemoncose.

Palavras Chave: Imunomodulação, Nematódeo, Probiótico, Ruminante.

Abstract

PINTO, Natália Berne. **Development of immunobiological inputs for the control of *Haemonchus contortus* in sheep.** 2020. 65f. Thesis (Doctor degree in Biological Sciences) - (Doctorate in Parasitology) - Postgraduate Program in Microbiology and Parasitology. Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2020.

Developing alternatives for the control of the gastrointestinal nematode of ruminants, *Haemonchus contortus*, is a necessary challenge for the continuity of sheep flocks around the world. The aim of this study was to evaluate the immunological and nematicide effects of the probiotics *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii* in sheep experimentally infected with de *Haemonchus contortus*, and to verify the immunogenicity of synthetic peptides selected by analyzing the genome of *H. contortus* in mice. In the first study, 18 sheep divided into a treatment group were used: animals supplemented with *S. cerevisiae* and infected with *H. contortus*, and a control group: animals infected without supplementation. In the second study, 24 sheep divided into a group supplemented with *S. boulardii*, a control group, and a Naive group (not infected and not supplemented). For the treatments, 40 mL of yeast suspension was used at a concentration of 1×10^7 CFU / mL, daily for 49 days. Parasitological parameters were evaluated: number of *H. contortus* eggs in the feces (OPG), number of infective larvae (L3) recovered by fecal cultures and the parasitic load of the abomasum. For immunological parameters, the following were quantified: immunoglobulins IgA in mucus and serum IgG; cytokines IL-4, IL-5 and IL-10; number of eosinophils in the abomasum mucosa and groups of cells positive for the markers: MHCII, CD4 + CD25 +, CD5 + CD8 +, WC4, CD5 + CD4 + and CD5 + WC1 by total peripheral blood flow cytometry. For the evaluation of the immunogenicity of the peptides, 40 mice were used, divided into four groups, of which one group remained as a control, and the other three were vaccinated with two doses, with an interval of 21 days, of their respective vaccine containing 20 µg of the peptide in 100µl of PBS and adsorbed on 10% Al(OH)₃, subcutaneously. Individual blood samples were taken weekly to evaluate, by indirect ELISA, the immunogenicity of the peptides. The results of the experiments with *Saccharomyces* demonstrated a significant decrease ($p < 0.05$) in the number of larvae in the *S. cerevisiae* group and a 48% reduction in the OPG of the group treated with *S. boulardii*. In both treatments, significantly higher levels of serum IgG ($p < 0.05$) and positive cells for MHCII were observed. In the *S. cerevisiae* group, there was also a significantly higher number of eosinophils ($p < 0.05$) in the mucosa, as well as in the number of CD4 + CD25 +, CD5 + CD8 + cells. The three peptides tested were shown to be immunogenic from the second dose. Thus, this study showed the beneficial local and systemic probiotic action of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii* in the immune response of sheep infected with *H. contortus*, and nematicide action demonstrated mainly by the reduction in the number of L3 and eggs recovered from the feces of supplemented sheep. In addition, the peptides tested are promising for the development of a new vaccine for the control of haemoncose.

Keywords: Immunomodulation, Nematode, Probiotic, Ruminant.

Lista de Figuras

Figura 1	Artigo 1: Resumo gráfico	21
Figura 2	Artigo 1: Figura 1: Numero de larvas de <i>H. contortus</i>	32
Figura 3	Artigo 1: Figura 2: Quantificação de IgG do soro dos ovinos.....	32
Figura 4	Artigo 1: Figure 3: Quantificação celular por citometria de fluxo.	32
Figura 5	Manuscrito 1: Figura 1: Compendio de resultados com a quantificação de OPG, IgG, larvas, MHC II e eosinófilos.....	42
Figura 6	Manuscrito 1: Figura 2: Quantificação celular por citometria de fluxo	43
Figura 7	Manuscrito 2: Figura 1: Quantificação de IgG de camundongos vacinados com o peptídeo 1.....	50
Figura 8	Manuscrito 2: Figura 2: Quantificação de IgG de camundongos vacinados com o peptídeo 2.....	50
Figura 9	Manuscrito 2: Figura 3: Quantificação de IgG de camundongos vacinados com o peptídeo 3.....	51
Figura 10	Manuscrito 2: Figura 4: Titulação do soro dos camundongos dos três grupos vacinados do último dia de coleta.....	51

Lista de Tabelas

Tabela 1	Manuscrito 1: Tabela 1: Médias da quantificação por OPG.....	42
----------	--	----

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. HIPÓTESE	12
3. OBJETIVOS	12
3.1. Objetivo Geral	12
3.2. Objetivos Específicos	12
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
4.1. <i>Haemonchus contortus</i>	13
4.2. Resposta imune aos nematódeos	14
4.3. Métodos de controle.....	15
4.3.1. Controle químico	15
4.3.2. Controle biológico.....	15
4.3.3. Controle imunológico.....	16
4.4. <i>Saccharomyces</i> spp.	17
4.4.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
4.4.2. <i>Saccharomyces boulardii</i>	18
5. ARTIGO.....	19
5.1. Artigo 1.....	19
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (YT001) supplementation for the control of <i>Haemonchus contortus</i> and modulation of the immune response of sheep.....	19
5.2. Manuscrito 1.....	33
Sheep immune-stimulated with <i>Saccharomyces boulardii</i> show reduced prolificacy of <i>Haemonchus contortus</i>	33
5.3. Manuscrito 2.....	44
Avaliação da imunogenicidade de peptídeos de <i>Haemonchus contortus</i> em camundongos.....	44
6. Doutorado Sanduiche	54
7. CONCLUSÕES GERAIS	57
8. REFERÊNCIAS	58
9. ANEXOS.....	62

1. INTRODUÇÃO

Os animais de produção são uma das fontes de renda mais relevantes ao redor do mundo. Ruminantes, como bovinos, ovinos e caprinos, são uma fonte importante de proteína animal. A sua criação em extensão ou confinados garante que populações com baixa e alta tecnificação consigam suprir suas necessidades alimentares com estes rebanhos.

Os problemas sanitários que acometem os ovinos constituem um limitante para a sua produção. Os prejuízos econômicos e as mortes causadas por parasitos gastrointestinais são recorrentes e estão frequentemente associadas as categorias jovens do rebanho (ROCHA *et al.*, 2005). O controle desta infecção é realizado com a utilização de produtos químicos comerciais, porém as décadas de utilização indiscriminada, com elevada dose e frequência, geraram populações de parasitos multirresistentes muitas vezes impossibilitando o seu controle (SALGADO e SANTOS, 2016).

O aumento da quantidade da utilização destes químicos é nocivo para a fauna e flora na região onde estes hospedeiros estão inseridos. Os resíduos podem permanecer por meses no ambiente levando a morte de insetos e um desequilíbrio dos ecossistemas (ERZEN *et al.*, 2005). Além disso, estes produtos tem sido detectados em diversos produtos de origem animal destinados ao consumo humano, como no leite e na carne (PADILHA, 1996).

Os nematódeos gastrintestinais de ruminantes estão presentes geralmente em infecções mistas e seu principal representante é o *Haemonchus contortus*. Este parasito é caracterizado por possuir como órgão de eleição o abomaso, onde se fixam, perfuram a mucosa e se alimentam do sangue do hospedeiro. Este habito alimentar gera no hospedeiro uma anemia severa, mas também este intimo contato estimula o sistema imune do ruminante a combater a infecção (EMERY *et al.*, 2016).

Inúmeras alternativas de controle estão sendo estudadas para reduzir a infecção dos hospedeiros, dentre as quais destaca-se o uso de fitoterápicos, vacinas, melhoramento genético, suplementação proteica e a utilização de microrganismos como fungos e bactérias (MOLENTO *et al.*, 2013). Muitos destes métodos visam o controle dos nematódeos no hospedeiro, onde estão a menor parte de sua população, outros tem como objetivo o controle a longo prazo reduzindo a contaminação das pastagens. Porém, a vantagem das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii* avaliadas no presente estudo é de possuírem potencial de atuar na fase de vida livre e na fase parasitária do ciclo deste nematódeo. E se associado a isto, consiga-se prevenir o estabelecimento de novas infecções através de vacinação, teremos não só um método de controle, mas uma estratégia integrada para a redução da população de *Haemonchus contortus*.

2. HIPÓTESE

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii* possuem ação probiótica em ovinos levando a redução da população de *Haemonchus contortus*.

Peptídeos selecionados *in silico* do genoma de *H. contortus* são imunogênicos em modelo murino.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver um método de controle de *H. contortus* baseado na utilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii* com potencial probiótico e nematocida e na expressão de antígenos vacinais recombinantes, para a redução da infecção no hospedeiro e da contaminação no ambiente.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar em ovinos as espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii* com melhor ação contra *H. contortus*;
- Observar a ação nematocida no ambiente de *Saccharomyces* spp. por teste de inibição da eclodibilidade e por coprocultura;
- Quantificar a infecção parasitária dos ovinos após necropsia;
- Identificar parâmetros envolvidos na resposta imune sistêmica como as interleucinas 4, 5 e 10, e as células positivas para os marcadores MHCII, CD4+CD25+, CD5+CD8+, WC4, CD5+CD4+ e CD5+WC1;
- Quantificar as imunoglobulinas IgG e IgA presentes na resposta imune sistêmica e local;
- Quantificar os eosinófilos avaliando a resposta imune de mucosa;
- Avaliar em camundongos peptídeos com potencial imunogênico contra *H. contortus*.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. *Haemonchus contortus*

Presente em todo o mundo, *Haemonchus contortus* é um parasito clássico do Filo Nematoda, Família Trichostrongylidae, ou seja, um nematódeo cilíndrico, de corpo não segmentado e os machos apresentando bolsa copulador com espículos. Porém, apresenta uma importante condição que torna a sua infecção mais patogênica, a característica de alimentação por hematofagia (EMERY *et al.*, 2016).

A infecção deste nematódeo ocorre pela ingestão da larva de terceiro estágio por um ruminante. A sua fixação ocorre no abomaso, onde irá se alimentar e copular e em média com 21 dias a fêmea inicia a liberação de ovos que irão para o ambiente junto as fezes do hospedeiro. Após a liberação, os ovos evoluem de acordo com o binômio tempo e temperatura. Quanto menor a temperatura, maior o tempo para que as larvas atinjam o estado infectante. Em condições ideais de temperatura próxima a 28 °C e umidade relativa de 80%, em sete dias o ovo evoluiu para larva de primeiro (L1), segundo (L2) e terceiro estágio (L3). As larvas nos primeiros dois estágios se alimentam de bactérias e fungos presentes nas próprias fezes e a L3 vai permanecer com uma dupla cutícula e migrar para a pastagem aumentando as suas chances de ser ingerida (ZAJAC, 2006).

Sendo assim, este parasito possui um ciclo de vida monoxênico, ou seja, sem a presença de hospedeiros intermediários, e apresenta uma fase de desenvolvimento no hospedeiro e outra no ambiente. A maior parte de sua população, cerca de 95%, se encontra no ambiente. É um fator que aumenta a patogenicidade deste nematódeo é a característica de grande prolificidade de suas fêmeas, que liberam aproximadamente 5000 ovos/dia (EMERY *et al.*, 2016).

O controle destes parasitos foi por muitos anos exclusivamente realizado por anti-helmínticos comerciais. Atualmente todas as moléculas comerciais disponíveis

enfrentam em algum nível resistência por parte das populações de parasitos (MELO & BEVILAQUA, 2002). Dentre os nematódeos gastrintestinais de ruminantes *H. contortus* é o que mais rapidamente apresenta a característica de resistência a produtos químicos em uma população (MELO *et al.*, 2003). Dentre outros, se credita maior capacidade de sobrevivência a este nematódeo por seu alto potencial biótico e por sua grande variabilidade genética (MELO & BEVILAQUA, 2005).

4.2. Resposta imune aos nematódeos

A relação íntima entre parasito e hospedeiro durante milhares de anos resultou na capacidade de ambos coexistirem e manterem um equilíbrio populacional. Os ovinos, por barreiras físicas e imunológicas, se especializaram na defesa de infecções por nematódeos e em contrapartida os parasitos desenvolveram métodos de escape que possibilitaram a perpetuação de suas espécies (MAIZELS & MCSORLEY, 2016).

Parasitos são organismos muito complexos, e por isso a resposta imune desenvolvida para o seu controle é muito diversa. Para nematódeos gastrintestinais, como *Haemonchus contortus*, que se desenvolvem no trato digestório de seus hospedeiros, é necessário uma que vários mecanismos de defesa sejam ativados. Além da resposta imediata, como a barreira física, com o aumento do peristaltismo, da produção de muco e a ativação de células, a resposta adaptativa, caracterizada por ser tardia e longínqua, é essencial para o êxito do hospedeiro (JANEWAY, 2001).

A resposta imunológica inata tem como principal célula recrutada em uma invasão por helmintos, os eosinófilos. Estes são mediados por linfócitos T associados a interleucinas e são efetivos por sua citotoxicidade (PERRIGOUÉ *et al.*, 2008). Já a adaptativa, corresponde a reação específica desenvolvida pelo organismo do hospedeiro a uma invasão de seu sistema. Esta resposta inicia com a ativação e produção de células de defesa e se mantém com as imunoglobulinas. Esta reação inicia com o reconhecimento dos antígenos específicos por células apresentadoras de antígenos profissionais que expressão, em sua parede, o complexo MHC-II. Uma vez este antígeno apresentado a um linfócito T, este é ativado e diferenciado em linfócitos do tipo helper 1 (Th1) e helper 2 (Th2) e com

isso passa a modular a produção de imunoglobulinas por linfócitos B (ELSE & FINKELMAN, 1998). A principal imunoglobulina produzida em ruminantes frente a nematódeos é a IgG, esta será responsável pela memória e continuidade da resposta imunológica de ovinos ao *Haemonchus contortus* (PASTORET *et al.*, 1998). Imediata ou tardia, inata ou adaptativa, tudo ocorre concomitantemente e são igualmente importantes para o resultado de sucesso na manutenção da produtividade do hospedeiro.

4.3. Métodos de controle

4.3.1. Controle químico

Atualmente encontra-se disponível sete diferentes classes químicas de anti-helmínticos para o controle de *Haemonchus* spp. São eles: Benzimidazóis, Imidazotiazóis, Lactonas macrocíclicas, Salicilanilidas, Substitutos fenólicos, Organofosforados e Derivados de amino acetonitrila. Estes anti-helmínticos foram disponibilizados no Brasil a partir da década de 60 e foram por muito tempo a solução para o controle de nematódeos gastrintestinais dos rebanhos de ruminantes (AMARANTE, 2014). A última molécula disponibilizada no Brasil foi o Monepantel, do grupo dos Derivados de amino acetonitrila, que começou a ser comercializada em 2012.

Para todos estes grupos de antiparasitários já foram descritas populações resistentes. E não é incomum encontrar parasitos que sobrevivem a vários deles, que são classificados como multirresistentes (SALGADO & SANTOS, 2016). A alta prolificidade e o curto período pré-patente de *H. contortus* confere maior capacidade de selecionar, em sua população, indivíduos resistentes (EMERY *et al.*, 2016).

4.3.2. Controle biológico

Visando o desenvolvimento de novos produtos para a redução das populações de helmintos, diversos microrganismos estão sendo estudados. Destes, as bactérias são os mais amplamente testados no controle de nematódeos,

sendo que para muitas já foi possível comprovar a sua eficácia (SINOTT *et al.*, 2012; PAGE *et al.*, 2019). No controle de *Haemonchus contortus* em bovinos, a ação nematicida de uma espécie de *Bacillus* já foi descrita. Inclusive sendo possível a utilização concomitante de anti-helmínticos comerciais (PINTO *et al.*, 2017).

Fungos também são promissores como parte de uma estratégia integrada de combate a parasitos patogênicos. Sua ação é majoritariamente física, pela apreensão e penetração nas larvas de nematódeos pelas suas hifas. Resultado dos esforços nesta linha de pesquisa, encontra-se disponível um produto comercial, o BioVerm®, que contém o fungo predador *Duddingtonia flagrans* para o controle de *H. contortus* (BRAGA *et al.*, 2020).

Os estudos com leveduras ainda estão no princípio, sendo poucos os relatos de sua ação em helmintos. Acredita-se que a melhora da resposta imune dos hospedeiros seja a principal forma de atuação destes microrganismos, porém ainda há muito para se elucidar neste tema.

4.3.3. Controle imunológico

O controle imunológico é baseado no desenvolvimento de vacinas que consigam desenvolver e/ou melhorar a resposta do sistema imune do hospedeiro ao parasito. Existe diversos métodos para a construção dessa alternativa de controle, porém ainda não foi possível estabelecer um alvo com eficácia satisfatória sem a necessidade de muitas revacinações. A única vacina comercial existente para *Haemonchus contortus*, a Barbervax®, exige 5 doses para alcançar um bom nível de proteção em ovinos (SINGH *et al.*, 2019).

Muitas vezes o custo alto com a experimentação em ovinos dificulta investimentos para a seleção de um novo alvo vacinal. A tecnologia da vacinologia reversa tem como vantagem realizar uma pré-seleção *in silico* de peptídeos com potencial imunogênico, permitindo assim que os testes em animais sejam feitos com um número menor de moléculas e que estas tenham maior probabilidade de serem eficazes (MOXON *et al.*, 2019).

4.4. *Saccharomyces* spp.

São diversas as espécies de leveduras descritas, e muitas delas estão presentes em nosso cotidiano. As leveduras são microrganismos unicelulares e pertencentes ao Reino Fungi, um dos gêneros amplamente descritos é *Saccharomyces* spp., conhecido popularmente como fungo do açúcar (HARTWELL, 1974).

Este microrganismo se multiplica rapidamente por brotamento e é utilizado na produção do pão, da cerveja e do vinho. Além disso, estes microrganismos são considerados probióticos, pois a sua utilização em humanos e animais traz efeitos benéficos principalmente no combate a distúrbios do sistema gastrintestinal (DAS *et al.*, 2016).

A vantagem de sua utilização como probiótico são as características de ser termorresistente, poder ser liofilizadas, e de ser resistente à antimicrobianos e aos sucos do trato gastrintestinal (BODDY *et al.*, 1991; VAN DER AA KÜHLE *et al.*, 2005). Essas propriedades são importantes principalmente por que permitem a administração por via oral e o tratamento concomitante com antibióticos. Além disso, comercialmente facilita a apresentação do produto, permitindo que ele seja disponibilizado em pó e também acrescido em alimentos como iogurtes para humanos (DOS SANTOS *et al.*, 2019) e rações para animais (NEUMANN *et al.*, 2016).

Estes microrganismos podem beneficiar um indivíduo basicamente de três formas, pela modulação do sistema imune inato e adquirido, local e sistêmico, fazendo com que a resposta seja mais eficiente pelo hospedeiro; pela ação direta sobre patógenos, principalmente por competição na adesão da mucosa; e ainda eles podem atuar inativando ou eliminando as substancias eliminadas por patógenos como as toxinas (OELSCHLAEGGER, 2010).

Apesar dessas possibilidades, o efeito imunomodulador parece ser o de maior relevância. Assim, é possível destacar a capacidade de gerar maior aporte de eosinófilos locais e proteção sistêmica com a produção de interleucinas, levando a uma proteção da mucosa do trato digestório dos hospedeiros, local este onde por exemplo se ancora o *H. contortus* (ROOS *et al.*, 2010).

4.4.1. *Saccharomyces cerevisiae*

A aproximadamente 5000 anos atrás os egípcios já haviam registrado a utilização de um microrganismo capaz de ser utilizado para a fabricação de pães, fazendo-os crescer e conferindo uma textura leve a eles, e para a fabricação de bebidas alcoólicas. Estas constatações se devem ao produto do processo chamado fermentação, onde a levedura *Saccharomyces cerevisiae* adquire energia para se manter através do consumo de açúcar do meio, convertendo-o em etanol e dióxido de carbono (FERREIRA *et al.*, 2010).

A utilização deste microrganismo como probiótico é muito recente e mais frequente na medicina animal (VAN DER AA KÜHLE *et al.*, 2005; CHAUCHEYRAS-DURAND & DURAND, 2009). Os seus efeitos benéficos são descritos principalmente em ruminantes, melhorando a sua digestibilidade e estabilizando o pH ruminal, gerando assim uma melhora na conversão alimentar e consequentemente na produtividade do rebanho (CHAUCHEYRAS-DURAND & DURAND, 2009).

4.4.2. *Saccharomyces boulardii*

Esta levedura foi primeiro descrita no início do século passado quando foi isolada no continente Asiático de uma fruta local chamada lechia (*Litchi chinensis*). Concomitante a sua descoberta, foi reconhecido o seu efeito benéfico para o homem, quando se observou que a sua administração reduzia os efeitos da diarreia (FLORASTOR, 2003). Desde seu primeiro registro até os dias atuais este microrganismo tem sido utilizado amplamente no combate a distúrbios gastrintestinais em humanos, e tem demonstrado excelentes resultados (POSADA *et al.*, 2018).

Em modelos experimentais, esta levedura já demonstrou ser capaz de minimizar o potencial de infecção por *Toxocara canis* protegendo o hospedeiro pelo aumento da produção de IL-12 e regulação da IL-10. Assim sugerindo que o efeito deste microrganismo na imunomodulação da produção de interleucinas neste hospedeiro é um fator importante no controle de infecções por nematódeos (AVILA *et al.*, 2016).

5. ARTIGO

5.1. Artigo 1

***Saccharomyces cerevisiae* (YT001) supplementation for the control of *Haemonchus contortus* and modulation of the immune response of sheep**

Natália Berne Pinto; Emanuelle Baldo Gaspar; Alessandro Pelegrine Minho; Robert Domingues; Micaele Quintana de Moura; Antonio Sergio Varela Junior; Gabriela de Almeida Capella; Patrício Azevedo dos Santos; Caroline Maciel da Costa; Fabio Pereira Leivas Leite

Aceito na Revista Beneficial Microbes
<https://doi.org/10.3920/BM2019.0120>

Normas da revista disponíveis em:
<<https://www.wageningenacademic.com/journals/bm/guidelines>> Acesso em
janeiro de 2020.

Original Research

***Saccharomyces cerevisiae* (YT001) supplementation for the control of *Haemonchus contortus* and modulation of the immune response of sheep**

Nematode control and sheep immunomodulation with *Saccharomyces cerevisiae*

Natália Berne Pinto^{1*}; Emanuelle Baldo Gaspar²; Alessandro Pelegrine Minho³; Robert Domingues⁴; Micaele Quintana de Moura⁵; Antonio Sergio Varela Junior⁶; Gabriela de Almeida Capella⁷; Patrício Azevedo dos Santos⁸; Caroline Maciel da Costa⁹; Fabio Pereira Leivas Leite¹⁰.

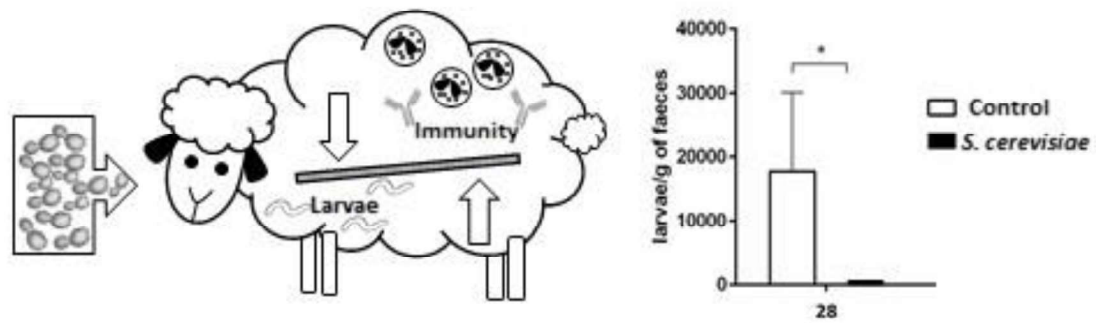
1. DVM, Universidade Federal de Pelotas, UFPel - Brazil. nbernevet@gmail.com
2. Research Scientist, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pecuária Sul - Brazil. emanuelle.gaspar@embrapa.br
3. Research Scientist, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pecuária Sul - Brazil. alessandro.minho@embrapa.br
4. Scientist, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pecuária Sul - Brazil. robert.domingues@embrapa.br
5. PhD, Universidade Federal de Pelotas, UFPel - Brazil. micaele_m@yahoo.com.br
6. Professor, Universidade Federal do Rio Grande, FURG - Brazil. antoniovarela@furg.br
7. DVM, Universidade Federal de Pelotas, UFPel - Brazil. gabicapella@gmail.com
8. BS, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pecuária Sul - Brazil. patricio.azevedo@hotmail.com
9. BS, Universidade Federal de Pelotas, UFPel - Brazil. carolinemacielpcosta@yahoo.com.br
10. PhD Professor in Biotechnology, Universidade Federal de Pelotas, UFPel - Brazil. fleivasleite@gmail.com

***Corresponding author:** Natália Berne Pinto

E-mail address: nbernevet@gmail.com

Postal address: Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário, S/N, Caixa Postal 354, CEP: 96010-900, Pelotas, RS, Brazil

Graphical abstract



Highlights

- Biological control of *Haemonchus contortus*;
- Reduction of *H. contortus* from sheep supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*;
- *Saccharomyces cerevisiae* act on the improvement of sheep immunity;
- Supplementation with *S. cerevisiae* reduce *H. contortus* larvae.

Abstract

Studies aimed at the development and evaluate of alternative methods to minimize losses caused by the gastrointestinal nematode (GIN) *Haemonchus contortus* are extremely important. Such research is essential, given the high morbidity rates among sheep and the significant mortality rates of lambs, allied to the low efficacy of commercial products for the control of this parasite. The purpose of this study was to evaluate the effect of the *Saccharomyces cerevisiae* (YT001 – YEASTECH) on the control of *H. contortus* and its modulation of the immune response in experimentally infected sheep. Eighteen sheep were divided into two groups. Group 1, the control group, comprised animals infected with *H. contortus* and supplemented with distilled water, while Group 2, the treated group, consisted of animals infected and supplemented with *S. cerevisiae* (400 million CFUs/day of suspension for 49 days). The following parasitological parameters were evaluated: number of eggs per gram of feces (EPG), number of infective larvae (L3) recovered per fecal culture, and parasitic load of the abomasum. The following immunological parameters were quantified: IgA immunoglobulins in the mucous secretions and serum IgG; cytokines IL-4, IL-5 and IL-10; number of eosinophils in the abomasal mucosa and groups of cells positive for the markers: MHCII, CD4⁺CD25⁺, CD5⁺CD8⁺, WC4, CD5⁺CD4⁺, CD8⁺CD11b⁺ and CD5⁺WC1 by whole blood flow cytometry. The results revealed a significant decrease ($p < 0.05$) in the number of larvae and significantly higher serum IgG levels ($p < 0.05$) in the group supplemented with *S. cerevisiae*. The supplemented animals showed significantly larger numbers of eosinophils ($p < 0.05$), as well as more cells positive for MHCII, CD4⁺CD25⁺, CD5⁺CD8⁺ than the control animals. This study confirmed the beneficial action of *Saccharomyces cerevisiae* on the host immune response to *H. contortus*, as evidenced mainly by the smaller number of L3 recovered from the feces of sheep supplemented with *S. cerevisiae*.

Keywords: biological control, yeast, nematodes, ruminants.

1. Introduction

Control of gastrointestinal nematodes (GIN) of ruminants is not always effective and has been responsible for numerous losses to livestock producers. Among contaminated herds, the greatest losses involve sheep, and there is an urgent need to minimize their morbidity and mortality rates given their economic importance (Ferguson et al. 2017).

Haemonchus contortus is the most important parasite that infects sheep in tropical and subtropical regions around the world (Nisbet et al., 2016). Its morbidity characteristics make it extremely pathogenic to its host (Sargison, 2012). In addition, studies have shown that among GINs, this genus is the one that most rapidly develops resistance to the anthelmintic drugs currently available (Lamb et al., 2017), a factor aggravated by the high prolificacy of females.

Research in the field of veterinary parasitology has made strides in the search for new forms of control of gastrointestinal nematodes (GIN) of ruminants. Numerous alternatives for the control of this nematode have been developed. However, only a few of them have proved to be effective in *in vivo* tests with ruminants. Moreover, the administration route chosen for the treatment of herds should facilitate handling of the animals on the farms, as is the case of the oral route. However, this means that the product must be resistant to the digestive juices. The use of probiotics composed of resistant microorganisms, such as yeasts, are therefore promising alternatives (Bautista-Garfias et al., 2001).

Yeasts are eukaryotic organisms that belong to the fungi kingdom, which includes the potential probiotic genus *Saccharomyces*. Moreover, they are organisms considered GRAS (generally recognized as safe) and their immunomodulatory action has already been described against nematodes (Avila et al., 2012; Moura et al., 2017), protozoan (Ribeiro et al., 2018), fungi and bacteria (Fidan et al., 2009). Yeasts are able to modulate mucosal protection by increasing the number of local eosinophils (Rosenberg et al., 2016) and by providing systemic protection by means of cytokine production, leading to protective immunomodulation of the mucosa of the hosts' digestive tract (Roos et al., 2010).

Aware of the need to find an efficient and viable alternative for the control of *Haemonchus contortus*, this study focused on evaluating the effect of the potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* (YT001) on this nematode and on the immune response of sheep infected by this parasite.

2. Materials and methods

2.1 Experimental design

The animals of this experiment were 18 male Corriedale lambs, eight months old, divided into two groups. Group 1 (G1), the untreated control group, comprised animals infected with *H. contortus* and treated only with distilled water, while Group 2 (G2), the treated group, consisted of animals infected and supplemented with *S. cerevisiae*.

Before beginning of experiment, the animals were caged at group level and spent 14 days adjusting to the environment and feed, after which they were supplemented with *S. cerevisiae* for 49 days. Then, 14 days after beginning the treatment, the sheep of G1 and G2 were artificially infected daily with 500 third instar larvae (L3) of *H. contortus* for 26 days.

The animals were kept indoors throughout the experimental period, given *ad libitum* access to water and *Lolium multiflorum* fodder and 1.2% of live weight per animal of concentrate once a day. This amount was readjusted weekly according to the animals' individual weight. All procedures were approved by the Ethics Committee for the Use of

Animals at the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) – Pecuária Sul under the authorization number 03/2017.

2.2 Acquisition and administration of the yeast

Saccharomyces cerevisiae strain (YT001 – YEASTECH) used in this study was kindly supplied by the Center of Biotechnology of the Federal University of Pelotas (UFPel), Brazil. The cultures were carried out in the Laboratory of Bacteriology and Immunology at the Institute of Biology of UFPel. The yeast was suspended in sterile saline solution and seeded on YPD (yeast extract peptone and dextrose) solidified with 2% agar (Difco) and incubated for 42 h at 28 °C. After this, it was multiplied in broth YPD liquid medium at 28 °C and stirred at 250 rpm for 72 h. The colony forming units (CFU) were counted and the culture was stored in amber flasks at 4°C until it was used. The yeast was administered orally to the animals every day, at the dose of 40 mL of suspension containing 1×10^7 CFUs/mL, beginning 14 days prior to infection of the animals with *H. contortus* and continuing for a further nine days after the period of infection was concluded.

2.3 Recovery of larvae and infection

Two sheep free of GIN infection, kept indoors, were infected with *H. contortus* to be used as L3 donors. The L3 were recovered from fecal cultures using the technique described by Robert and Sullivan (1950).

2.4 Parasitological parameters

The sheep feces were collected weekly directly from the rectal ampulla for EPG (eggs per gram) counting (Gordon and Whitlock, 1939), and at 14 days intervals for the recovery of infective larvae, using the fecal culture technique (Roberts and O'Sullivan, 1950), starting on the first day of treatment and ending 7 days after conclusion of the treatment. Seventy days after the animals were first housed, they were killed, the abomasum was removed and the contents were recovered and stored in 10% formalin at room temperature, for subsequent counting of adult parasites (parasite load). The organ was then immersed in 2% saline solution for 24 hours in an incubator at 28 °C and 80% RH (relative humidity), in order to recover immature parasites from the mucosa.

2.5 Immunological parameters

The total anti-*Haemonchus* serum IgG level was evaluated by indirect ELISA, using blood samples collected twice a week from sheep for 70 days, as described by Engvall and Perlmann (1972), with modifications. The test was standardized by cross titration and the antigen was obtained from third stage larvae of *H. contortus*, which were washed, macerated, sonication and centrifugation (Lacroux et al., 2006) with some modifications. The somatic antigen of *H. contortus* (SAH) larvae was used at a concentration of 52.3 µg per well, the serum was diluted to 1/400 and the anti-IgG conjugate to 1/4000 (Sigma-Aldrich). Briefly, serum samples were diluted and plated into 96-well plates (MaxiSorb®, Nunc) precoated with 52.3 µg of SAH /well in bicarbonate carbonate buffer, at pH 9.6, and blocked with 5% skim milk diluted in PBS with 0.05% Tween® 20 (Sigma). Anti-IgG conjugated with horseradish peroxidase (HRP) (Sigma-Aldrich) was then added. Colorimetric reactions were performed with 1 mg/ml of o-phenylenediamine (OPD) (Sigma-Aldrich) and 1 µl/ml of H₂O₂ (Sigma-Aldrich) diluted in citrate-phosphate buffer, pH 5.0. The reaction was stopped with 4N H₂SO₄ (Sigma-Aldrich). Absorbance was measured at 492 nm, using a microplate reader (SpectraMax, Molecular Devices). Between each step, the plates were washed four times

with PBS containing 0.05% Tween® 20 (Sigma-Aldrich). Samples were processed in duplicate and the results were expressed as the mean OD₄₉₂. Results were analyzed as percentage of positivity (PP) in relation to a strongly positive control (PC), as following: [PP = (mean OD₄₉₂ for each animal/mean OD₄₉₂ for PC)*100].

Abomasal mucus was collected after the animals were killed, diluted in 2.5mL/g of protease inhibitor, and stored individually at -20 °C for IgA screening by indirect ELISA (Amarante et al., 2005). The SAH larvae was used at a concentration of 52.3 µg per well, the mucus was diluted at 1/25 and the anti-IgA 1/10000 (Sigma-Aldrich) conjugate were used as standard for this analysis, as described for IgG.

Samples from the abomasum of each sheep were sectioned (2 cm²), fixed in 10% formaldehyde for 24 h and embedded in paraffin. Eosinophils were quantified from 5 µm sections stained with hematoxylin-eosin. Fifteen random fields from the muscle layer to the surface of the mucosa were examined under 400x magnification, corresponding to an area of 0.04mm² (adapted from Balic et al., 2002).

Blood samples were collected on days 0, 35 and 56 of the experiment to obtain serum for the evaluation of cytokines IL-4, IL-5 and IL-10. The serum was analyzed by ELISA [Sheep Interleukin 4 (IL-4) ELISA Kit, Sheep Interleukin-5 (IL-5) ELISA Kit, and Sheep Interleukin 10 (IL-10) ELISA Kit, Cusabio®], according to the manufacturer's instructions.

2.6 Flow cytometry

Quantitative and qualitative analysis of the cells were performed by flow-cytometry. The Attune® Acoustic Focusing Flow Cytometer (Applied Biosystems, USA) was used. Each sample was exposed to 2 mM of Hoechst 33342–H33342 (Sigma-Aldrich, USA) for 5 min before each analysis. Events were detected by fluorochrome with violet laser (UV 405 nm) and photomultiplier (PMT) VL1 (450/40 nm) filter. The acquisition rate was 200 events–totaling 20000 events per sample. All assays were performed in duplicate. The non-lymphocytes events were eliminated from analysis by scatter plots of FSC × SSC and negative fluorescence of H33342 events (debris). All venous whole blood was collected and anti-coagulated with EDTA (adapted from Rosato et al., 2001).

Briefly, to stain the samples, 90 µL whole blood was dispensed, 10 µL respective reagent was added, and the tube was vortexed and incubated for 30 min for each antibody (primary or secondary). The cells were labeled for CD4 (1/100), CD11b (1/100), CD8 (1/100), WC1 (1/100), CD25 (1/50), MHC-II (1/100), CD5 (1/100) and WC4 (1/100). The material was incubated for 15 min, followed by the addition of anti-IgG1 (1/200), anti-IgG2a (1/200) and anti-IgG2b (1/200). At the end of the incubation time, 900 µL of a BD proprietary buffered lysing solution containing (BD Biosciences, San Jose, CA) was added to each tube, and tubes were incubated again for 15 min.

2.7 Statistical analysis

The D'Agostino-Pearson normality test was initially applied to all the data obtained. In the comparisons between the two groups, parametric tests were used to analyze the normal data or the normalized transformed data. Non-parametric tests were applied to non-normal data.

The Mann-Whitney U test was applied between the groups on the same dates to evaluate the EPG. A two-way ANOVA was applied to the fecal culture, followed by the Tukey post test, for the analysis between dates within the groups, followed by the Sidak post-test for comparison between the groups on each date. Student's *t*-test was employed to compare the number of adult worms recovered from the abomasum, the amount of IgA in mucosa and of IgG in serum, and the percentage of cellular subpopulations in the blood of

the animals. The analyses and graphs were performed using GraphPad Prism version 7.0 software.

3. Results

3.1 Parasitological parameters

The larvae recovered from the fecal culture 28 days after the beginning of the experimental infection indicated that the average number of infective larvae recovered from G2 treated with *S. cerevisiae* (50 larvae) was significantly lower, $p < 0.05$, than those recovered from G1 (17700 larvae) (Figure 1). The EPG of feces (treated = 2105 and control = 1584) and adult parasite load found in the abomasum of dead animals (treated = 1860 and control = 930) showed no significant difference between the treated group and the control group.

3.2 Immunological parameters

The ELISA results indicated that, throughout the experiment, G2 treated with *S. cerevisiae* showed a tendency for ELISA values of anti-*H. contortus* IgG ($DO_{492} = 1.279$, PP = 86.437) 14% higher, on average, than controls ($DO_{492} = 1.095$, PP = 102.690). Actually, at 21 days after the beginning of treatment (Figure 2), G2 treated with *S. cerevisiae* showed statistically higher levels of IgG (1.112) ($p < 0.05$) than G1 (0.805) (Figure 2). However, the two groups showed no statistical difference in anti-*H. contortus* IgA levels in the abomasal mucosa collected on the day the animals were killed.

The eosinophil count of G2 was twice as high ($p < 0.05$) (292,75 cells/mm²) as that of G1 (143 cells/mm²). An evaluation of IL-4, IL-5 and IL-10 cytokine production showed no significant difference between G2 and G1, either during or after the treatment.

The flow cytometry analysis indicated that G2, supplemented with the yeast and infected with *H. contortus*, showed a statistically higher ($p < 0.05$) number of cells positive for MHC II (dendritic cells, macrophages and B lymphocytes), CD4⁺CD25⁺ (activated T lymphocytes) and CD8⁺CD11b⁺ (leukocytes) than G1, which was only infected. The CD5⁺CD8⁺ count (T lymphocytes) showed the opposite trend, since this count in G1 (56.8) was statistically higher ($p < 0.05$) than that of G2 (39.2) in terms of the percentage of cells. However, the analysis of WC4⁺, CD5⁺CD4⁺ and CD5⁺WC1⁺ showed no difference between the two groups (Figure 3).

4. Discussion

Methods alternatives to the chemical control of gastrointestinal nematodes in sheep are sorely needed, given the difficulties due to anthelmintic resistance, as well as people's growing awareness of and preference for foods containing lower levels of chemical residues. In recent years, potential probiotics have been evaluated for the control and treatment of infections by different parasites, and have been shown to positively modulate the immune response of hosts (Avila et al., 2012; Avila et al., 2016; Moura et al., 2017; Temsahy et al., 2015; Silva et al., 2018; Solano-Aguilar et al., 2018; Hessenberger et al., 2016). These microorganisms can benefit an individual by the β -glucan that modulates the innate and acquired immune system; by direct action on pathogens, mainly by competition in mucosal adhesion; and yet they can act by proteases, inactivating or eliminating pathogen substances such as toxins (Oelschlaeger, 2010).

In our study, the administration of *S. cerevisiae* in sheep significantly reduced ($p < 0.05$) the number of *H. contortus* larvae recovered from fecal cultures (99%), at day 28 post-infection (PI), suggesting that the presence of *S. cerevisiae* impaired the fertility of *H. contortus* eggs. Silva et al. (2018) reported similar findings, i.e., an average decrease of 60%

in the recovery of *H. contortus* larvae from fecal cultures of goats orally treated for 15 days with *S. cerevisiae* hydrolysate. Temsahy et al. (2015), who also studied nematodes, confirmed at 28 day after infection significant reductions in *Trichinella* larvae of 87.92, 74.88, and 60.98% upon using *Lactobacillus plantarum* strain P164, *Lactobacillus casei* strain ATCC 7469, and *Lactobacillus acidophilus* strain P110, respectively.

The increase in eosinophil number in the abomasal mucosa of treated animals suggests that *S. cerevisiae* was the determining factor in the improvement of the immune response of sheep against *H. contortus*, since these cells have been found to provide protection against parasites (Balic et al., 2000). Pathak et al. (2014) also reported an increase in the population of eosinophils in the mucosa of sheep and protection against *H. contortus*, when *S. cerevisiae* was added to condensed tannin feed.

In Canaria Hair Breed (CHB) sheep infected with *H. contortus*, Hernández et al. (2017) found that the greater the activation of T cells and the larger the number of eosinophils in the lower abomasum, the smaller the size of the females and the fewer the number of eggs in the uterus of this parasite, suggesting that these cells were essential in inhibiting its fecundity and thus preventing the maintenance of this population. These findings suggest that one of the pathways of T cells activation is the direct or indirect activation of eosinophils. Thus, our study corroborates the findings of Hernández et al. (2017), since we found a larger number of eosinophils and T cells and fewer recovered larvae in treated animals.

In this study, we found an increase in the serum anti-*H. contortus* IgG levels of sheep treated with *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. The findings of Roos et al. (2018), who studied a different *Saccharomyces* species, coincided with those of our study, i.e., upon administering *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* for a period of 28 days in the sheep feed, they found that it significantly increased the serum IgG levels, during the evaluation period, against bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5). A significant increase in total IgG1 levels, in the colostrum of mares and serum of foals born from mares supplemented with *S. cerevisiae* during gestation and for 180 days postpartum has also been reported (Ayad et al., 2017), thus demonstrating the promising potential of probiotic supplementation to boost the concentrations of this immunoglobulin in the blood.

The results of the analysis of IgA from the abomasal mucosa showed no statistical difference between the groups. This can be explained by the low concentration of IgA in the mucosa of ruminants (Pastoret et al., 1998; Campos et al., 2016). Another point that should be considered is the period when this analysis was performed, since the IgA level of the abomasal mucosa increases significantly close to the tenth day post-infection (Charley-Poulain et al., 1984).

Avila et al. (2016) fed *S. boulardii* to mice infected experimentally with *Toxocara canis* and observed its protective effect against infection by this parasite since fewer larvae were found in the supplemented group than in the control group. In the same study, no difference was found in the levels of mRNA of IL-4, nor IL-10. Those previous results corroborate ours, since we were not able to demonstrate any significant difference in serum levels of the same cytokines. We also tested IL-5 and no difference in its level was demonstrated after supplementation with *S. cerevisiae* in sheep.

Sheep lineages genetically selected for resistance to parasitic infection were infected with the parasite *Trichostrongylus colubriformis*, a nematode of the same family as *H. contortus*, and in the same way as this study, they showed higher levels of activated T lymphocytes (CD4⁺CD25⁺) in resistant animals, underscoring the importance of this type of cell in the control of nematodes infections (Greer et al., 2018). CD4⁺ and CD25⁺ T cells play an essential role in the maintenance of tolerance to endogenous antigens and in the

regulation of immune response to external antigens, protecting the host from injury (Siqueira-Batista et al., 2012). The augmented levels of MHC II-positive cells observed in this study indicate a larger number of professional antigen presenting cells in circulation, induced by *S. cerevisiae* supplementation, which is critical for an efficient response against extracellular infectious agents, such as *H. contortus*. The action of this cell type is the determining factor for the establishment of this parasite, and a decrease of MHC II expression in the cells of its host has recently been described as an evasion mechanism used by *H. contortus* (Ehsan et al., 2018). CD8⁺CD11b⁺ are proinflammatory cells and are related to increased phagocyte function. Thus, the increase of its population in the supplemented group suggests an improvement in the immune response. (Wagner et al., 2001). The significant decrease in the number of circulating CD5⁺CD8⁺ cells in the treated group suggests that cytotoxic T cells migrated to infection fighting sites. Kambara and McFarlane (1996) described the migration of these cells into the peripheral blood and to the target sites of infection in sheep infected with *Trichostrongylus colubriformis* and treated with larger amounts of dietary protein.

Thus, this study found that sheep supplemented with *S. cerevisiae* culture presented not only an increase in the number of defense cells at the systemic level and at the infection site but also an increase in anti-*H. contortus* IgG and significantly fewer *H. contortus* larvae in the feces of the supplemented group when compared to the control group.

5. Conclusion

The oral administration of the potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* in sheep infected with *H. contortus* significantly improved their systemic and local immune response against the parasite, and also reduced the number of infective larvae recovered from feces. However, further experiments with a larger number of animals are needed to elucidate the effect of the microorganism on the fecundity of *Haemonchus contortus*.

Acknowledgements

This work was supported by the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pecuária Sul [02.13.10.009.00.00] and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – [Finance Code 001].

6. References

- Amarante, AFT, Bricarello, PA, Huntley, JF, Mazzolin, LP, Gomes, JC, 2005. Relationship of abomasal histology and parasite-specific immunoglobulin A with the resistance to *Haemonchus contortus* infection in three breeds of sheep. *Veterinary Parasitology* 128(1-2), 99-107.
- Avila, LFDC, Conceição, FR, de Lima Telmo, P, Dutra, GF, de los Santos, DG, Martins, LHR, Berne, MEA, Silva, PE, Scaini, CJ, 2012. *Saccharomyces boulardii* reduces infection intensity of mice with toxocariasis. *Veterinary Parasitology* v. 187, p. 337-340.
- Avila, LDC, De Leon, PMM, De Moura, MQ, Berne, MEA., Scaini, CJ, Leivas Leite, FP, 2016. Modulation of IL-12 and IFN γ by probiotic supplementation promotes protection against *Toxocara canis* infection in mice. *Parasite Immunology* 38(5), 326-330.
- Ayad, MA, Benallou, B, Saim, MS, Derrar, S, Benzineb, FZ, Haddouch, Z, Abdelhadi, SA, 2017. Effect of supplementing arabian and barbe pregnant mares with *Saccharomyces cerevisiae* on Colostrum IgG1 Concentration in Algerian Breed. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences* 7(4), 1-6.
- Balic, A, Bowles, VM, Meeusen, ENT, 2002. Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasite Immunology* 24, 39-46.

- Balic, A, Bowles, VM, Meeusen, EN, 2000. The immunology of gastrointestinal nematodes in ruminants. *Advances in Parasitology*. 45, 181-241.
- Bautista-Garfias, CR, Ixta-Rodríguez, O, Martínez-Gómez, F, López, MG, Aguilar-Figueroa, BR, 2001. Effect of viable or dead *Lactobacillus casei* organisms administered orally to mice on resistance against *Trichinella spiralis* infection. *Parasite (Paris, France)*. 8, 226-228.
- Campos, AGS, Santos, RAD, Afonso, JAB, Soares, PC, Fagliari, JJ, Silva, PC, Mendonça, CLD, 2016. Electrophoretic profile of the colostrum of ewes supplemented with propylene glycol and cobalt associated with vitamin B12 in late pregnancy. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 36, 95-100.
- Charley-Poulain, J, Luffau, G, Pery, P, 1984. Serum and abomasal antibody response of sheep to infections with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 14(2), 129-141.
- Ehsan, M, Wang, W, Gadahi, JA, Waqqas Hasan, M, Lu, M, Wang, Y, Song, X, 2018. The Serine/Threonine-Protein Phosphatase 1 from *Haemonchus contortus* is Actively Involved in Suppressive Regulatory Roles on Immune Functions of Goat PBMCs. *Frontiers in Immunology* 9, 1627.
- El Temsahy, MM, Ibrahim, IR, Mossallam, SF, Mahrous, H, Bary, AA, Salam, SAA, 2015. Evaluation of newly isolated probiotics in the protection against experimental intestinal trichinellosis. *Veterinary Parasitology* 214(3-4), 303-314.
- Engvall, E, Perlmann, P, 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA: III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *Journal of Immunology* 109(1), 129-135.
- Ferguson, DM, Fisher, A, Colditz, IG, Lee, C, 2017. Future challenges and opportunities in sheep welfare. *Advances in Sheep Welfare* 285-293.
- Fidan, I, Kalkanci, A, Yesilyurt, E, Yalcin, B, Erdal, B, Kustimur, S, Imir, T, 2009. Effects of *Saccharomyces boulardii* on cytokine secretion from intraepithelial lymphocytes infected by *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Mycoses*. 52(1), 29-34.
- Gordon, HM, Whitlock, HV, 1939. A New Technique for Counting Nematode Eggs in sheep faeces. *Journal of the Council of Scientific & Industrial Research* 12, 50-52.
- Greer, AW, McKenzie, JL, McAnulty, RW, Huntley, JF, McNeilly, TN, 2018. Immune development and performance characteristics of Romney sheep selected for either resistance or resilience to gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* 250, 60-67.
- Hernández, JN, Meeusen, E, Stear, M, Rodríguez, F, Piedrafita, D, González, JF, 2017. Modulation of *Haemonchus contortus* infection by depletion of $\gamma\delta^+$ T cells in parasite resistant Canaria Hair Breed sheep. *Veterinary Parasitology* 237, 57-62.
- Hessenberger, S, Schatzmayr, G, Teichmann, K, 2016. In vitro inhibition of *Eimeria tenella* sporozoite invasion into host cells by probiotics. *Veterinary Parasitology* 229, 93-98.
- Kambara, T, McFarlane, RG, 1996. Changes in T cell subpopulations of sheep due to age and dietary protein intake; association with protective immunity to *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 51(1-2), 127-135.
- Lacroux, C, Nguyen, THC, Andreoletti, O, Prevot, F, Grisez, C, Bergeaud, JP, Jacquet, P, 2006. *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. *Veterinary Research* 37(4), 607-622.
- Lamb, J, Elliott, T, Chambers, M, Chick, B, 2017. Broad spectrum anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* in Northern NSW of Australia. *Veterinary Parasitology* 241, 48-51.
- Moura, MQ, da Silva, TW, Jeske, ST, de Castro, LM, Pinto, NB, da Costa, AL, Leivas Leite, FP, Berne, MEA, 2017. Evaluation of the transcription of interleukin-12 in the intestinal

- mucosa of mice subjected to experimental toxocariasis and supplemented with *Saccharomyces boulardii*. *Veterinary Parasitology* 242, 59.
- Nisbet, AJ, Meeusen, EN, González, JF, Piedrafita, DM, 2016. Immunity to *Haemonchus contortus* and vaccine development. *Advances in Parasitology* 93, 353-396.
- Oelschlaeger, TA, 2010. Mechanisms of probiotic actions – a review. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(1), 57-62.
- Pathak, AK., Dutta, N, Pawaiya, RVS, Sharma, K, 2014. Influence of condensed tannins containing leaf meal mixture on histopathological changes in *Haemonchus contortus* infected sheep. *Indian Journal of Veterinary Pathology* 38(4), 231-234.
- Pastoret, PP, Griebel, P, Bazin, H, Govaerts, A, 1998. Immunology of Cattle. In: *Handbook of Vertebrate Immunology*, Academic Press, San Diego, CA, pp. 439-484.
- Ribeiro, MRS, Oliveira, DR, Oliveira, FMS, Caliari, MV, Martins, FS, Nicoli, JR, Torres, MF, Andrade, MER, Cardoso, VN, Gomes, MA (2018). Effect of probiotic *Saccharomyces boulardii* in experimental giardiasis. *Beneficial microbes*, 9(5), 789-797.
- Roberts, FHS, O'Sullivan, PJ, 1950. Methods for eggs-counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research* 1(1), 99-102.
- Roos, TB, Tabeleão, VC, Dümmer, LA, Schwegler, E., Goulart, MA, Moura, SV, Corrêa, MN, Leite, FPL, Gil-Turnes, C., 2010. Effect of *Bacillus cereus* var. Toyoi and *Saccharomyces boulardii* on the immune response of sheep to vaccines. *Food Agricultural Immunology* 21 (2), 113–118.
- Roos, TB, de Moraes, CM, Sturbelle, RT, Dummer, LA, Fischer, G, Leite, FPL, 2018. Probiotics *Bacillus toyonensis* and *Saccharomyces boulardii* improve the vaccine immune response to Bovine herpesvirus type 5 in sheep. *Research in Veterinary Science* 117, 260-265.
- Rosato, MT, Jabbour, AJ, Ponce, RA, Kavanagh, TJ, Takaro, TK, Hill, JP, Faustman, EM, 2001. Simultaneous analysis of surface marker expression and cell cycle progression in human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Immunological Methods* 256(1-2), 35-46.
- Rosenberg, HF, Masterson, JC, Furuta, GT, 2016. Eosinophils, probiotics, and the microbiome. *Journal of Leukocyte Biology* 100(5), 881-888.
- Sargison, ND, 2012. Pharmaceutical treatments of gastrointestinal nematode infections of sheep—Future of anthelmintic drugs. *Veterinary Parasitology* 189(1), 79-84.
- Silva, NC, Lima, AS, Silva, CR, Brito, DR, Cutrim-Junior, JA, Milhomem, MN, Costa-Junior, LM, 2018. In vitro and in vivo activity of hydrolyzed *Saccharomyces cerevisiae* against goat nematodes. *Veterinary Parasitology* 254, 6-9.
- Siqueira-Batista, R., Gomes, AP, Azevedo, SFM, Vitorino, RR, Mendonça, EG, Sousa, FO, 2012. Linfócitos T CD4⁺CD25⁺ e a regulação do sistema imunológico: perspectivas para o entendimento fisiopatológico da sepse. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*.
- Solano-Aguilar, G, Shea-Donohue, T, Madden, KB, Quinoñes, A, Beshah, E, Lakshman, S, Urban, JF, 2018. *Bifidobacterium animalis subspecies lactis* modulates the local immune response and glucose uptake in the small intestine of juvenile pigs infected with the parasitic nematode *Ascaris suum*. *Gut microbes*. 9(5), 422-436.
- Wagner, C, Hänsch, GM, Stegmaier, S, Deneffle, B, Hug, F, Schoels, M, 2001. The complement receptor 3, CR3 (CD11b/CD18), on T lymphocytes: activation-dependent up-regulation and regulatory function. *European journal of immunology*. 31(4), 1173-1180.

Legends to Figures

Figure 1: Number of *H. contortus* larvae. The data represent the mean (+/- standard deviation) number of larvae recovered from the fecal cultures of the group treated with *Saccharomyces cerevisiae*, G2, and the untreated control group (G1) on days 28 and 42 post-infection ($p < 0.05$).

Figure 2: Percentage of positivity of the dynamics of total serum IgG. The data represent the mean (+/- standard deviation) IgG level in the serum of sheep infected experimentally with *Haemonchus contortus* and treated or not (control) with *Saccharomyces cerevisiae* for 70 days, measured at 14-day intervals. The asterisks (*) represent statistical differences ($p < 0.05$) between the groups.

Figure 3: Flow cytometry analysis of peripheral blood lymphocytes (PBL). The data represent the mean cell patterns of the cells of sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus* and supplemented with *Saccharomyces cerevisiae* (G2) and of the control group (G1) for 70 days. The asterisks (*) represent statistical ($p < 0.05$) differences between the groups.

Figure 1

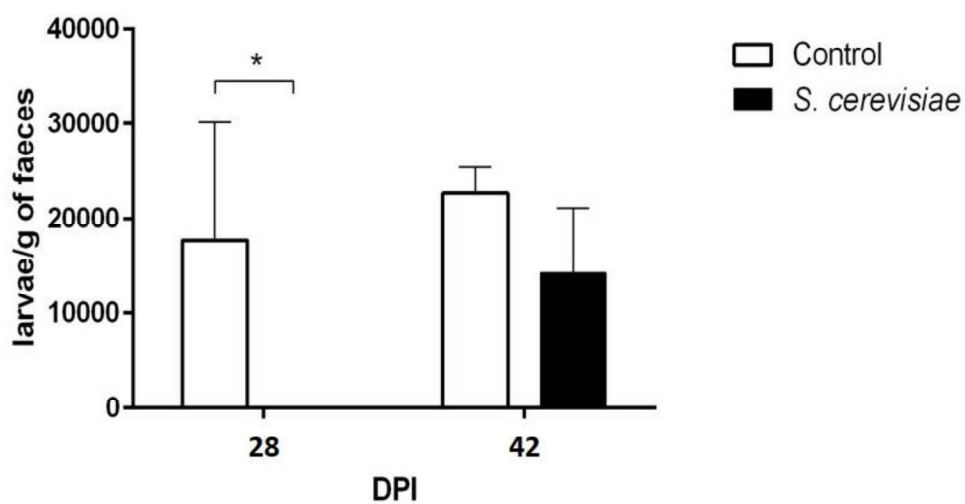


Figure 2

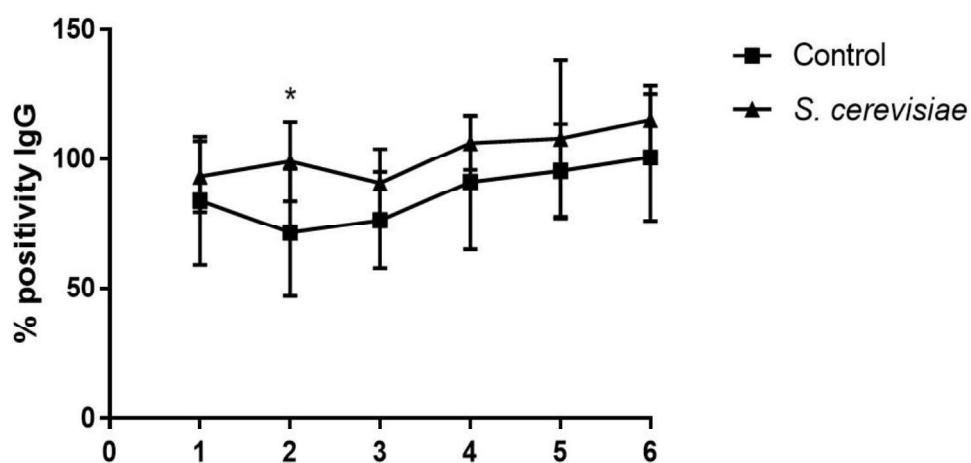
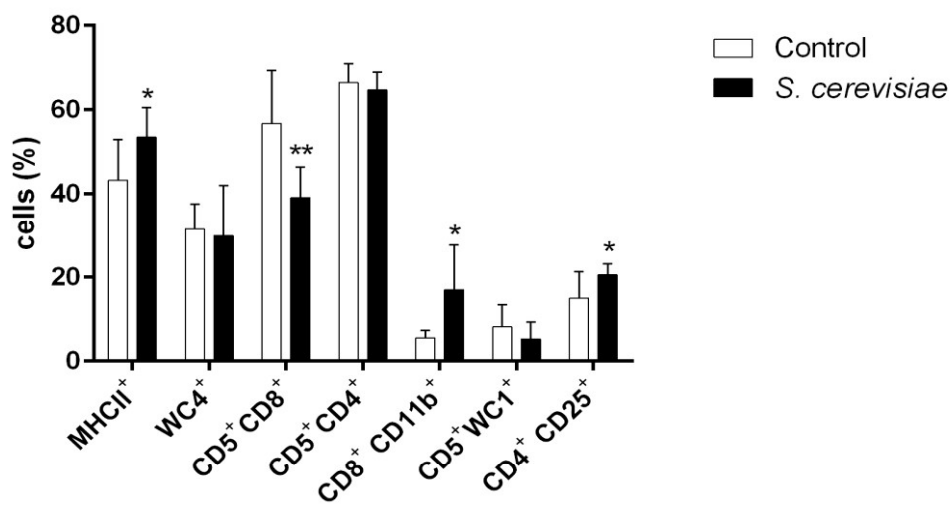


Figure 3



5.2. Manuscrito 1

Sheep immune-stimulated with *Saccharomyces boulardii* show reduced prolificacy of *Haemonchus contortus*

Natália Berne Pinto; Emanuelle Baldo Gaspar; Alessandro Pelegri Minho;
Robert Domingues; Micaele Quintana de Moura; Antonio Sergio Varela Junior;
Gabriela de Almeida Capella; Adriane Leites Strothmann; Fabio P. Leivas Leite

Submetido à Revista Parasitology Research

Normas da revista disponíveis em:
<<https://www.springer.com/journal/436/submission-guidelines>>
Acesso em janeiro de 2020.

Sheep immune-stimulated with *Saccharomyces boulardii* show reduced prolificacy of *Haemonchus contortus*

Natália Berne Pinto¹; Emanuelle Baldo Gaspar²; Alessandro Pelegrine Minho³; Robert Domingues²; Micaele Quintana de Moura¹; Antônio Sergio Varela Junior¹; Gabriela de Almeida Capella¹; Adriane Leites Strothmann¹; Fabio Pereira Leivas Leite¹

¹ Federal University of Pelotas – UFPel, RS, Brazil

² Brazilian Agricultural Research Corporation, Embrapa Pecuária Sul, Brazil

³ Brazilian Agricultural Research Corporation, Embrapa Pecuária Sudeste, Brazil

ABSTRACT

Profitable sheep farming requires efficient sanitary management, and parasitism by *Haemonchus contortus* (*Hc*) is known to be a serious limitation in sheep rearing. The objective of this study was to evaluate the immunomodulatory and nematicidal effect of *Saccharomyces boulardii* (*Sb*) in sheep experimentally infected with *Hc*. To this end, 24 sheep were divided into three groups: one infected with 500 *Hc* larvae/day and treated with *S. boulardii* (40×10^8 CFU/mL/day), a control group only infected but not treated, and a naïve group that never came into contact with parasites. The humoral response was assessed by ELISA for the production of serum anti-*Hc* IgG and evaluated for the production of cytokines (IL-4, -5, -10). Cell populations with markers for MHCII, CD4⁺CD25⁺, CD5⁺CD8⁺, WC4, CD5⁺CD4⁺, CD8⁺CD11b⁺ and CD5⁺WC1 were evaluated by flow cytometry. Parasitological analyses involved counting the number of eggs per gram of feces (EPG) and of larvae per fecal culture. At all the studied points, the concentration of immunoglobulins was statistically higher ($p < 0.05$) in the *Sb* group than in the naïve group, and statistically higher ($p < 0.05$) than in the infected group on days 42 and 70 of the experiment. No difference was found in cytokine expression, except for IL-10, which showed an increase in the infected control group. The cell analysis revealed a significantly higher ($p < 0.05$) expression of MHC-II in the *Sb* group (60.05%) than in the Naïve (44.32%) and infected control (43.28%) groups, and a larger quantity of eosinophils in the mucosa (353.25 cells/mm²) than in the control group (143 cells/mm²). There was a reduction in EPG on all the analyzed days, with a significant reduction of 48% on day 39 in the group treated with *Sb* compared to the control group. As for larvae numbers, the mean numbers were lower in the *Sb* group compared to the control group. Thus, it can be concluded that supplementation with *S. boulardii* modulated the immune response, increasing the production of IgG and the expression of MHC-II and eosinophils and inhibiting IL-10. This modulation decreased the number of *Haemonchus contortus* eggs in the feces. Thus, supplementation with *Saccharomyces boulardii* had a significantly beneficial effect on the treated sheep, potentiating the fight against the parasite *H. contortus*.

Keywords: Nematodes, probiotics, ruminants, immune system

1. INTRODUCTION

A competent, adequate and effective immune response is essential for all animals to fight infections. In parasitic infections, the host's ability to respond to this attack is what determines whether the result will be resistance, resilience, the onset of the disease, or even the host's death (Frainer et al. 2018).

Sheep are a host species highly susceptible to parasitic infections, and gastrointestinal parasitism has led to significant production losses throughout the world (Gibbs, 1985). Thus, improving the immunological status of sheep is essential to combat their main health problem, infection with *Haemonchus contortus*.

H. contortus is a nematode that attaches itself to the mucosa of the abomasum in ruminants, where it feeds on the blood of its host. When a sheep's immune response is triggered in sufficient intensity and specificity, this close contact facilitates its effectiveness in reducing infection (Macdonald et al., 2002).

The yeast *Saccharomyces boulardii*, a probiotic, has been widely studied in the search for feasible alternatives to enhance the immune response in mammals (Moura et al. 2017; Kerry et al. 2018). This microorganism acts by modulating the systemic and local levels of immunoglobulins, interleukins and defense cells (Guarner et al., 2011).

The aim of this study was to evaluate the immune response of sheep supplemented with *Saccharomyces boulardii* against infection with the nematode *H. contortus*.

2. METHODS

2.1 Animals

Twenty-four 8-year-old male Corriedale sheep were used in this study. Eight of them were born and kept housed under controlled feeding, and were used as naïve sheep free of parasitic infections. A month before the experiment started, the other 16 sheep, which were born in the field, were housed, treated with Zolvix® (2.5 mg/kg dose) for the total elimination of gastrointestinal nematodes (NGI), and divided into two groups (a control group and a group treated with *S. boulardii*).

The sheep of the naïve group were kept out of contact with NGI throughout the experimental period, while the animals of the control and treated groups were infected with third-stage larvae (L3) of *H. contortus*. Throughout the experiment, all the animals were fed water and roughage *ad libitum*, plus 12% of live weight per animal of concentrate once a day. This amount was readjusted weekly according to each sheep's individual weight.

2.2 Treatment and challenge

The yeast was produced and stored for later administration to the animals. To this end, it was suspended in sterile saline and seeded in YPD (yeast extract peptone dextrose) solidified with 2% agar (Difco) and incubated for 42 hours at 28°C. It was then reseeded and grown for 72 h in liquid YPD at 28°C under an agitation speed of 250 rpm. After this, the *S. boulardii* suspension was stored in amber flasks at 4°C, and its colony-forming units (CFU)

were counted before it was used. The *S. boulardii* strain used here was supplied by the Center for Technological Development of the Federal University of Pelotas (UFPeL), Brazil.

Every day for 49 consecutive days, the animals in the treated group were fed 40 mL of the *S. boulardii* suspension containing 1×10^8 CFUs/mL, while the animals of the control group were given the same volume of distilled water daily.

Two weeks after beginning the treatment, the challenge was initiated by means of a daily oral administration of approximately 500 infectious *H. contortus* larvae, for 26 days. These larvae came from donor sheep maintained experimentally at Embrapa Pecuária Sul in Bagé, state of Rio Grande do Sul.

2.3 Quantification of *H. contortus* eggs, larvae and adults

Individual fecal samples were collected twice a week to count the eggs per gram of feces (EPG) using the Gordon and Whitlock technique (1939), and fortnightly to recover and count the larvae (Roberts and O'Sullivan, 1950).

To quantify the adult parasites, the entire content of the abomasum was removed when the sheep were slaughtered at the end of the experiment, and was stored in 10% formaldehyde for subsequent analysis.

2.4 Immunological assessments

Blood was drawn every 14 days from all the sheep involved in the experiment in order to obtain individual serum samples. Total serum anti-*Haemonchus* IgG was examined using the indirect ELISA technique. The assay was standardized by cross-titration. The plates were adsorbed with somatic antigen from *H. contortus* third-stage larvae (L3). To obtain antigen, the L3 were washed, macerated, subjected to freeze-thaw cycles, sonication and centrifugation (Lacroux et al. 2006). Proteins were quantified by the Lowry method (Bio-Rad DC Protein Assay). The somatic antigen of *H. contortus* larvae was used at a concentration of 52.3 µg of protein per well; the serum was diluted to 1/400 and the anti-IgG conjugate to 1/4000 (Sigma-Aldrich).

Briefly, serum samples were diluted and placed in Nunc MaxiSorb 96-well plates precoated with the protein diluted in 0.5M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6, and blocked with 5% skimmed milk diluted in PBS with 0.05% Tween® 20 (Sigma). Anti-IgG conjugated with horseradish peroxidase (HRP) (Sigma-Aldrich) were added. Colorimetric reactions were developed with SIGMAFAST™ OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride) tablets, following the manufacturer's instructions. The reaction was stopped with 4N H₂SO₄ (Sigma-Aldrich). Absorbance was read at 492 nm in a Bio-Rad iMark microplate reader. The samples were analyzed in duplicate and the results were expressed as the mean optical density (OD₄₉₂) (Engvall and Perlmann, 1972, with modifications).

To evaluate the cytokines IL-4, IL-5 and IL-10, blood samples were collected to obtain serum on days 0, 35 and 56 of the experiment. The serum was analyzed by ELISA, using ELISA Kits from Cusabio®: Sheep Interleukin 4 (IL-4), 5 (IL-5), and 10 (IL-10)], according to the manufacturer's instructions.

2.5 Cellular assessment

The host's cells in the blood and in the abomasum mucosa were evaluated. This involved a quantitative and qualitative analysis of the circulating cells by flow cytometry of the venous whole blood collected individually and anticoagulated with EDTA, using an Attune® acoustic focusing flow cytometer (Applied Biosystems, USA). Before each analysis, each sample was exposed for 5 minutes to 2 mM of Hoechst 33342-H33342 (Sigma-Aldrich, USA). The events were detected using a fluorescence microscope equipped with UV filter (UV 405 nm) and a VL1 photomultiplier tube (PMT) detector (450/40 nm). The acquisition rate was 200 events, making a total of 20000 events per sample. All the assays were performed in duplicate. Non-lymphocyte events were eliminated from the analysis by FSC × SSC scatter plots and negative fluorescence of H33342 events (adapted from Rosato et al. 2001).

Briefly, to mark the samples, 90 µL of whole blood was used, 10 µL of reagent was added, and the sample was vortexed and incubated for 30 min for each antibody (primary or secondary). The cells were labeled for CD4 (1/100), CD11b (1/100), CD8 (1/100), WC1 (1/100), CD25 (1/50), MHC-II (1/100), CD5 (1/100) and WC4 (1/100). The material was incubated for 15 min, followed by the addition of anti-IgG1 (1/200), anti-IgG2a (1/200) and/or anti-IgG2b (1/200), depending on the subtype of the primary antibody used. At the end of the incubation time, 900 µl of a buffered red blood lysed solution (BD Biosciences, San José, CA) was added to each tube and the material was incubated for another 15 min.

In the assessment of the abomasum mucosa of sheep, eosinophils were quantified from 5µm sections stained with hematoxylin and eosin. To this end, individual samples from the funicular region of the abomasum were sectioned (2cm²), fixed in 10% formalin for 24h and embedded in paraffin. Fifteen random fields were examined under 400x magnification, from the muscle layer to the mucosal surface, corresponding to an area of 0.068mm² (adapted from Balic et al. 2000).

2.6 Statistical assessment

The results of all the assessments were analyzed statistically by means of ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison post-test with 5% and 10% levels of probability, to compare the values of the group treated with *S. boulardii*, the infected control group, and the naïve control group. These analyses were performed and graphs created using GraphPad Prism, version 7.0 software.

3. RESULTS

A comparison of the mean EPG on days 21, 28, 31, 35, 38 and 42 post infection revealed a progressive reduction in EPG between the control group and the group treated with *S. boulardii*. This reduction reached 48% on day 38, with a statistically significant difference ($p < 0.10$) between the mean EPG of the group supplemented with *S. boulardii* (2219 eggs) compared to that of the control (4269 eggs) (Table 1). As for larvae count (Figure 1), a tendency was found for a decrease in the mean count of the treated group (11667

larvae) compared to the control group (17700 larvae) in the same period. However, the groups showed no difference in the number of adult *Haemonchus contortus* worms.

The serum immunoglobulin concentration differed significantly ($p < 0.05$) in terms of IgG concentration between the treated and naïve groups on all the days when blood was collected, and between the treated group and the infected control group on the fourth (day 42) and sixth (day 70) days of collection. This indicates that treatment with *S. boulardii* induced an increase in IgG production at the systemic level (Figure 1).

Between the first and the last blood collection, the mean IL-10 cytokine levels increased significantly ($p < 0.05$) in the control group, but remained unchanged in the infected group supplemented with *S. boulardii*.

In the evaluation of whole blood, the cell analysis showed a higher quantity ($p < 0.05$) of MHC-II in the group treated with the probiotic (60.05%) than in the naïve (44.32%) and infected control (43.28%) groups. Moreover, the groups infected with *H. contortus* showed a statistically significant reduction in double positive $CD4^+CD25^+$ cells when compared to the naïve group (Figure 2). The quantification of eosinophils in the abomasum mucosa revealed a more than twofold higher number of these cells ($p < 0.05$) in the supplemented group (353.25 cells/mm²) than in the control group (143 cells/mm²), as indicated in Figure 1.

4. DISCUSSION

This study showed, for the first time, the effect of the probiotic yeast *S. boulardii* on the life cycle of a parasitic helminth, which was attributed to the improved immune response of its host.

At 21 days after infection with *H. contortus*, the females began oviposition, with no difference between the groups. Starting on day 28 after infection with *H. contortus*, the group supplemented with *S. boulardii* and the control group showed a difference in EPG. This suggests that, although both groups were infected, proliferation of the parasite in the treated group was hindered. This difference became evident 38 days post infection, when the EPG in the treated group was 48% lower than in the control group. Costa and Pereira (2018) also reported a reduction of 19.9% in EPG among primates (*Macaca mulata*) infected with the nematode *Trichuris trichiura* after 30 days of supplementation with the probiotic *Lactobacillus* spp.

The parasite's response to the host's immune system is to use evasive strategies in its attempt to decrease the host's immune response and increase its chances of survival (Maizels and Mcsorley, 2016). One of these strategies is to stimulate the production of IL-10, which is an anti-inflammatory interleukin (Gasbarre, 1997). Albarrak et al. (2018) found that the production of this interleukin in cattle presenting clinical signs of *Mycobacterium avium* infection was higher than in the control group and in the group with subclinical infection, thus indicating that the increase in IL-10 favors the development of the disease in the host. This has also been observed in sheep infected with *Fasciola hepatica*, in which an

overexpression of IL-10 in the liver was found in all the stages of infection (Pacheco et al. 2018).

Rosário et al. (2018) suggest that IL-10 suppresses the protective immune response, leading to the progression of leishmaniasis with increased parasite burden in the cells. A high IL-10 production implies that the macrophages and T cells of infected dogs produced IL-10 in response to *Leishmania* antigen, and that this production may be an important factor favoring the parasite's persistence in host cells. In our study, we found that supplementation with *S. boulardii* overcame the nematode's immunosuppressive effect, keeping IL-10 levels unaltered, unlike the control group, which showed an increase ($p < 0.05$) in IL-10 production. Avila et al. (2016) reported the same finding in mice supplemented with the same yeast and experimentally infected with *Toxocara canis*. In their study, although IL-10 expression in the control group increased, this difference was not observed in the treated group.

The MHC-II marker represents antigen-containing cells such as dendritic cells, macrophages and B lymphocytes. These cells are fundamental for the host's immune response (Charon et al. 2002). The flow cytometry test revealed that supplementation with *S. boulardii* promoted positive regulation ($p < 0.05$) of this cell phenotype, thus improving the sheep's immunity. A correlation between the presence of cells containing MHC-II molecules and resistance to gastrointestinal nematodes has already been described in ruminants (Outteridge et al. 1996; Charon et al. 2002), and appears to be a determining factor for the maintenance of health of infected animals. The naïve group presented a greater number ($p < 0.05$) of natural regulatory T cells (Treg) represented by the $CD4^+CD25^+$ marker. Natural Tregs are cells that develop during the selection process of T lymphocytes, and an increase in their production may have to do with antigen recognition (Piccirillo, 2008).

5. CONCLUSIONS

Supplementation with *Saccharomyces boulardii* modulated the immune response of sheep, increasing their production of IgG, MHC-II and eosinophils, and inhibited the parasite-induced production of anti-inflammatory interleukin IL-10. This immunomodulation is probably the factor responsible for the decline in *H. contortus* prolificacy. Thus, the beneficial effect of *Saccharomyces boulardii* for the control of *Haemonchus contortus* in sheep was demonstrated for the first time, which indicates that this probiotic yeast offers a potential alternative to decrease populations of this parasite.

Acknowledgements

This work was supported by the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pecuária Sul [02.13.10.009.00.00] and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – [Finance Code 001].

6. REFERENCES

- Albarrak SM, Waters WR, Stabel JR, Hostetter JM (2018) Evaluating the cytokine profile of the WC1+ $\gamma\delta$ T cell subset in the ileum of cattle with the subclinical and clinical forms of MAP infection Veterinary immunology and immunopathology, 201, 26-31.
- Avila LDC, de Leon PMM, De Moura MQ, Berne MEA, Scaini CJ, Leivas Leite FP (2016) Modulation of IL-12 and IFN γ by probiotic supplementation promotes protection against *Toxocara canis* infection in mice Parasite immunology, 38(5), 326-330.
- Balic A, Bowles VM, Meeusen ENT (2000) The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants Adv Parasitol, v45, p181-241.
- Charon KM, Moskwa B, Rutkowski R, Gruszczynska J, Świderek W (2002) Polimorfismo de microssatélites no gene DRB1 (classe II do MHC) e sua relação com a contagem de ovos fecais de nematódeos em ovinos da raça Polish Heath Sheep. Journal of Animal and Feed Sciences, 11 (1), 47-58.
- Costa MS, Pereira CAS (2018) Avaliação do efeito antiparasitário de probióticos em primatas do velho mundo mantidos em cativeiro no zoológico municipal de Volta Redonda-RJ. Cadernos UniFOA, 6(2 Esp), 42.
- Engvall E, Perlmann P (1972) Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA: III Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. Journal of Immunology 109(1), 129-135.
- Frainer A, McKie BG, Amundsen PA, Knudsen R, Lafferty KD (2018) Parasitism and the biodiversity-functioning relationship. Trends in ecology & evolution, 33(4), 260-268.
- Gasbarre LC (1997) Effects of gastrointestinal nematode infection on the ruminant immune system. Veterinary parasitology, 72(3-4), 327-343.
- Gibbs HC (1985). Effects of parasites on animal and meat production. Agis, FAO. Gaafar SM, Howard WE, Marsh RE (Eds), Parasites, Pests and Predators, Elsevier, New York, pp 7-27.
- Guarner F, Khan AG, Garisch J, Eliakim R, Gangl A, Thomson A, Fedorak, R (2011) Probióticos y prebióticos Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: probióticos y prebióticos, 1, 1-29.
- Gordon HM, Whitlock HV (1939) A New Technique for Counting Nematode Eggs in sheep faeces Journal of the CSIR 12, 50-52.
- Kerry RG, Patra JK, Gouda S, Park Y, Shin HS, Das G (2018) Benefaction of probiotics for human health: A review. Journal of food and drug analysis, 26(3), 927-939.
- Lacroux C, Nguyen THC, Andreoletti O, Prevot F, Grisez C, Bergeaud JP, Jacquet P (2006). *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. Veterinary Research 37(4), 607-622.
- Macdonald A, Araujo MI, Pearce EJ (2002) Immunology of parasitic helminth infection. Infection and Immunity 70:427-433.
- Maizels RM, McSorley HJ (2016) Regulation of the host immune system by helminth parasites. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 138(3), 666-675.
- Moura MQ, da Silva TW, Jeske ST, de Castro LM, Pinto NB, da Costa AL, Berne, MEA (2017) Evaluation of the transcription of interleukin-12 in the intestinal mucosa of mice

- subjected to experimental toxocariasis and supplemented with *Saccharomyces boulardii*. *Veterinary parasitology*, 242, 59.
- Outteridge PM, Anderson L, Douch PGC, Green RS, Gwakisa PS, Hohenhaus MA, Mikko S (1996) The PCR typing of MHC-DRB genes in the sheep using primers for an intronic microsatellite: application to nematode parasite resistance. *Immunology and Cell Biology* 74, 330-336.
- Pacheco IL, Abril N, Zafra R, Molina-Hernández V, Morales-Prieto N, Bautista MJ, Pérez J (2018) *Fasciola hepatica* induces Foxp3 T cell, proinflammatory and regulatory cytokine overexpression in liver from infected sheep during early stages of infection. *Veterinary research*, 49(1), 56.
- Piccirillo CA (2008) Regulatory T cells in health and disease. *Cytokine*, 43(3), 395-401.
- Roberts FHS, O'Sullivan PJ (1950). Methods for eggs-counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research* 1(1), 99-102.
- Rosário CJ, Dominici MF, Braga MS, Lima CA, Pereira JG, Melo FA (2018). Avaliação de IFN- γ e IL-10 em cães naturalmente infectados com *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi com e sem manifestações clínicas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38(4), 722-725.
- Rosato MT, Jabbour AJ, Ponce RA, Kavanagh TJ, Takaro TK, Hill JP, Faustman EM (2001) Simultaneous analysis of surface marker expression and cell cycle progression in human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Immunological Methods* 256(1-2), 35-46.

Table 1: Average EPG from sheep in the groups treated with *Saccharomyces boulardii* and in the control group after infection with *Haemonchus contortus* larvae.

EPG		
Days after infection	Control	<i>S. boulardii</i>
21	150	125
28	2017	1481
31	1906	1575
35 ^a	2525	1750
38 ^b	4269	2219
42 ^c	3963	3563

a: 1 day after the end of treatment

b: 4 days after the end of treatment

c: 8 days after the end of treatment

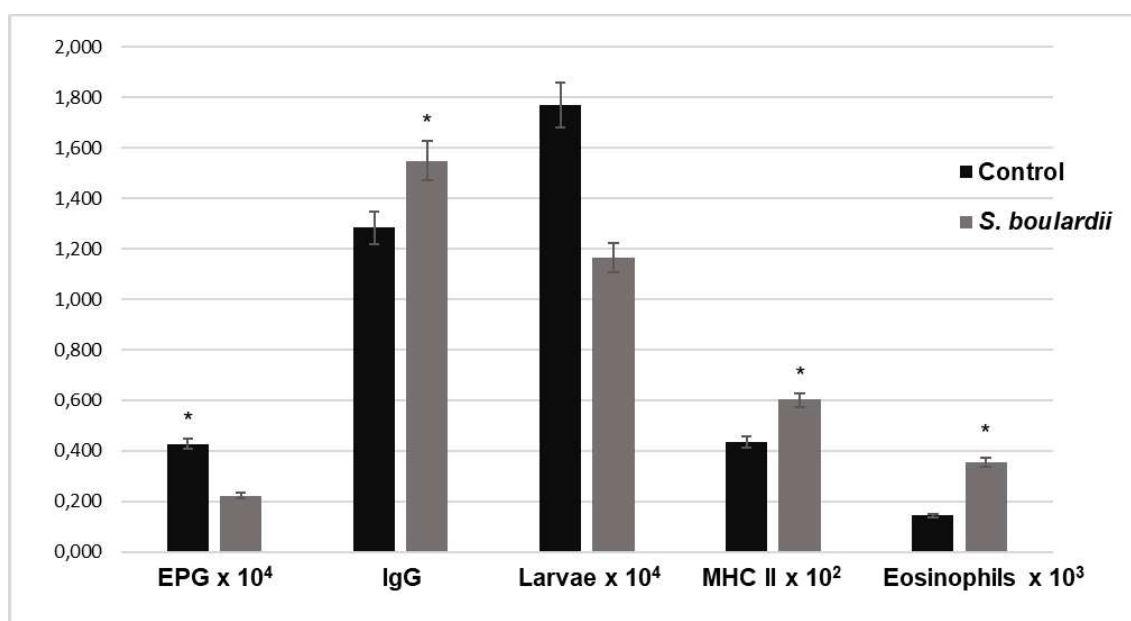


Figure 1: Mean results of the infected control group and the group treated with *Saccharomyces boulardii* with respect to the following parameters: eggs per gram of feces (EPG x10⁴), ELISA quantification of serum immunoglobulin G (IgG), number of larvae recovered in feces (Larvae x10⁴), quantification of cells positive for MHC II (MHC II x10²), and quantification of eosinophils in the abomasum mucosa (Eosinophils x 10³).

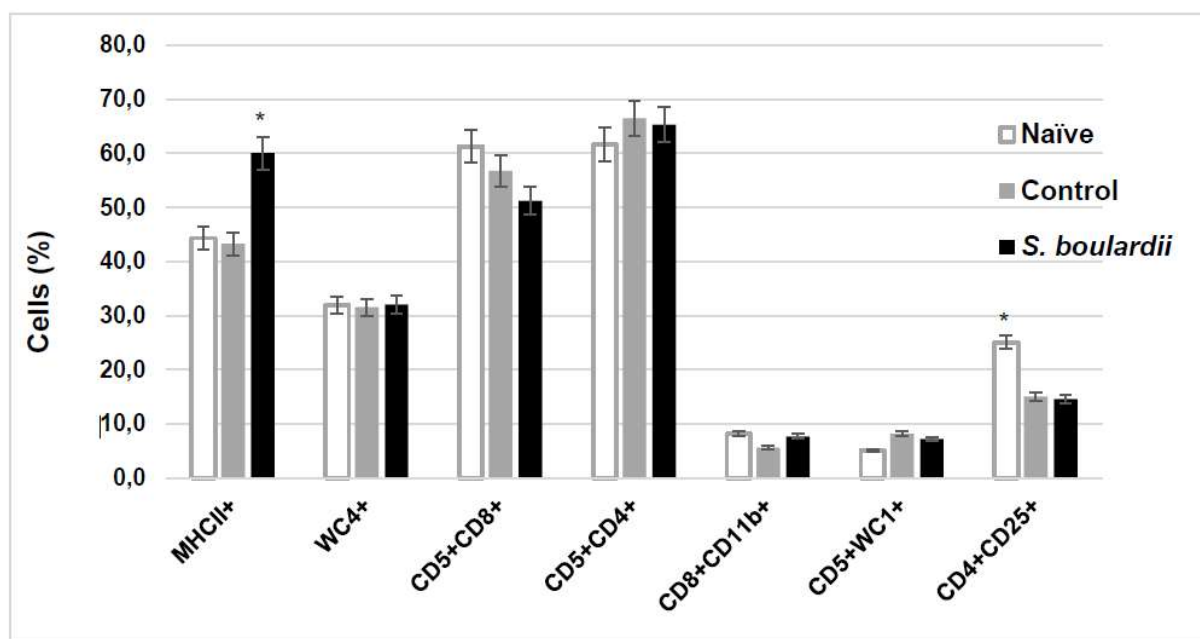


Figure 2: Quantification of cells by flow cytometry, using cell markers in individual whole blood of sheep treated with *Saccharomyces boulardii* and infected with *Haemonchus contortus*, and of infected and uninfected controls.

5.3. Manuscrito 2

Avaliação da imunogenicidade de peptídeos de *Haemonchus contortus* em camundongos

Natália Berne Pinheiro, Micaele Quintana de Moura, Pedro Machado Medeiros de Albuquerque, Rodrigo Casquero Cunha, Emanuelle Baldo Gaspar, Alessandro Pelegrine Minho, Robert Domingues, Gabriela de Almeida Capella, Wesley Douglas da Silva Terto, Fábio Pereira Leivas Leite

Manuscrito nas normas da UFPel

Avaliação da imunogenicidade de peptídeos de *Haemonchus contortus* em camundongos

Natália Berne Pinheiro¹, Micaele Quintana de Moura¹, Pedro Machado Medeiros de Albuquerque¹, Rodrigo Casquero Cunha¹, Emanuelle Baldo Gaspar², Alessandro Pelegrine Minho³, Robert Domingues², Gabriela de Almeida Capella¹, Wesley Douglas da Silva Terto¹, Fábio Pereira Leivas Leite¹

1. Universidade Federal de Pelotas, UFPel - Brazil.
2. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pecuária Sul, Brazil.
3. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pecuária Sudeste, Brazil.

Avaliação da imunogenicidade de peptídeos de *Haemonchus contortus* em camundongos

Resumo

A utilização de vacinas para prevenir doenças ao invés de apenas tentar combatê-las após a instalação da infecção, é uma alternativa de controle promissora. Neste estudo, o objetivo foi avaliar em modelo murino a imunogenicidade de três peptídeos selecionados a partir do genoma de *Haemonchus contortus*. Na construção da vacina foi realizado um ranqueamento *in silico* de possíveis alvos vacinais. Após a seleção de três peptídeos com potencial imunogênico, foram utilizados 40 animais divididos em 4 grupos com 10 indivíduos, sendo que destes, três grupos foram vacinados com um dos peptídeos 1, 2 ou 3 carreados pela molécula KLH (Keyhole limpet hemocyanin) e o outro grupo permaneceu como controle. A vacinação foi realizada em duas doses no dia 0 e no dia 21 do experimento utilizando 20µg do peptídeo em 100µl de PBS e adicionado 10% de hidróxido de alumínio. Semanalmente foi coletado sangue individualmente de todos os animais para obtenção do soro. A avaliação da resposta dos animais às imunizações foi realizada pela técnica de ELISA indireto, através da resposta de anticorpos séricos (IgG) anti-peptídeo. Os resultados demonstraram uma diferença significativamente maior entre a resposta ao peptídeo + KLH do que a resposta ao KLH e ao grupo controle na quinta coleta, ou seja, após a segunda dose da vacina. Essa diferença foi maior no grupo vacinado com o peptídeo 3, que teve valor 9.6 vezes maior para IgG contra o peptídeo. Já na avaliação por titulação no último dia de coleta, o peptídeo 2 foi o que apresentou maiores valores de absorbância na maior diluição. Com isso, é possível afirmar que os peptídeos selecionados foram imunogênicos, sendo promissores ao desenvolvimento de uma vacina para a prevenção de *Haemonchus contortus*.

Palavras chave: nematódeos, resposta imune humoral, vacina reversa

1. Introdução

A utilização de métodos para a imunização de hospedeiros frente a doenças causadas por parasitos é uma realidade. E a estratégia de prevenção a doença ao invés de trata-la após o aparecimento dos sintomas é muito benéfica tanto economicamente, como para a sanidade do rebanho. Há diferentes formas para o desenvolvimento de vacinas com potencial imunogênico, porém a vacinologia reversa possibilita a análise *in silico* de alvos vacinais através da predição de epítomos antigênicos e outras características de interesse (MOXON *et al.*, 2019). Deste modo aumentam a probabilidade de serem eficazes, além da possibilidade da produção em larga escala (HEWITSON & MAIZELS, 2014).

A haemoncose é uma doença causada pelo helminto *Haemonchus* spp. e que possui grande importância econômica, com especial relevância para a espécie *Haemonchus contortus* em rebanhos ovinos. Diversas vezes este parasito leva o seu hospedeiro a morte, principalmente pela anemia decorrente da espoliação sanguínea. Há relatos desta doença em quase todos os continentes, sendo um fator limitante em rebanhos de ruminantes em todo o mundo (EMERY *et al.*, 2016).

A necessidade de desenvolver um novo método de controle para esta enfermidade é eminente. A utilização durante décadas de anti-helmínticos com um manejo errôneo, resultou no surgimento de resistência por parte dos parasitos a todas as moléculas disponíveis atualmente. Aliado a isto, a alta capacidade de evolução deste nematódeo para sobreviver aos tratamentos é um desestímulo ao setor industrial ao desenvolvimento de novos químicos (SALGADO & SANTOS, 2016).

Estudos para o desenvolvimento de vacinas contra *H. contortus* já testaram desde vacinas inativadas contendo todo o parasito, até proteínas de subunidade específicas. A principal desvantagem destas é a necessidade de múltiplas doses para estimular uma resposta imune protetora satisfatória no hospedeiro. Peptídeos produzidos a partir de uma seleção prévia de softwares possuem uma probabilidade maior de serem efetivos (RAPPUOLI, 2000). A vacinologia reversa realizada pela seleção *in silico* de epítomos antigênicos, reduz muito o número de animais necessários nos testes para o desenvolvimento de uma nova vacina. Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar a imunogenicidade em camundongos de três diferentes peptídeos selecionados do genoma de *Haemonchus contortus*.

2. Metodologia

2.1 Produção da vacina

O conjunto de análises utilizadas para o desenvolvimento da vacina foi a de vacinologia reversa, ou seja, a predição *in silico* de alvos imunogênicos com base no genoma de *Haemonchus contortus* HCON disponibilizado no GenBank (número

de acesso: CAVP000000000.1). Para isso, os possíveis alvos vacinais foram selecionados por bioinformática utilizando o programa IMMUNORANK.

O ranqueamento foi realizado por características como a ligação com a molécula MHC II, a presença de epítomos de linfócito B, a similaridade com o genoma de ovinos e a similaridade com outros nematódeos gastrintestinais de ruminantes. Três peptídeos contendo de 17 a 20 aminoácidos foram selecionados, e produzidos pela empresa GENONE, que forneceu estes conjugados à molécula KLH (Keyhole limpet hemocyanin).

2.2 Desenho experimental

Foram selecionados 40 camundongos (*Mus musculus*) Balb/c machos com idade de 28 dias. Estes animais foram alocados em 8 gaiolas coletivas de polipropileno, contendo cinco animais em cada uma. Após dividiu-se duas caixas por grupo totalizando quatro grupos com 10 indivíduos, sendo destes um controle e três tratamentos.

O período total do experimento foi de 63 dias. Destes, os animais permaneceram 14 dias em adaptação ao ambiente, e então procedemos com o início da vacinação. A vacina foi aplicada nos três grupos tratamentos utilizando como adjuvante o hidróxido de alumínio [Al(OH)₃; Sigma Aldrich] a 10%. Foram realizadas duas doses de 100 µl/dose contendo 20µg do peptídeo, por via intramuscular com intervalo de 21 dias com seus respectivos peptídeos 1, 2 e 3.

Todos os animais foram submetidos a coleta de sangue para obtenção de soro no início do experimento (dia zero) e nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 42, colhidas das veias orbitais ou submandibulares. No dia 42 do experimento os animais foram submetidos a eutanásia por aprofundamento da anestesia com barbitúrico.

Os animais foram mantidos durante todo período de experimentação em ambiente com temperatura média de 21 °C, com alternância de período claro/escuro de 12 horas. Todos receberam água e ração *ad libitum*.

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, inscrito sob o código CEEA 11593-2018.

2.3 Avaliação

Para a avaliação da imunogenicidade dos peptídeos foi utilizada um ELISA indireto em todas as datas de coletas e para todos os animais. Previamente a técnica foi padronizada por titulação cruzada visando alcançar as melhores diluições para os testes. Com isso, o peptídeo conjugado a molécula KLH foi adsorvido na placa de polietileno de 96 poços na concentração de 1.4µg/poço, nesta mesma concentração também foi utilizado o KLH isolado para o teste das mesmas amostras. Após 1 h houve o bloqueio utilizando leite em pó 5%, seguido da adição de soro, do grupo tratado com o respectivo peptídeo, diluído na

proporção 1/25 em duplicata. Após, foi adicionado o anti-IgG conjugado a peroxidase de rábano (HRP) na concentração de 1/20000. No intervalo entre todas estas etapas, foi realizada quatro lavagens utilizando PBS com 0,05% de Tween® 20.

Por último foi adicionado o OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride) para gerar a reação colorimétrica e após 10 min a solução H₂SO₄ 4N para a parada da reação. Os resultados da reação foram expressos como a média de densidade óptica (OD₄₉₂) por grupo.

Com o objetivo de avaliar a diferença de título de IgG anti-peptídeo entre os grupos no último dia de coleta, A mesma técnica foi realizada com o pool do soro dos animais do dia 42 de coleta. Para isso foram utilizadas as mesmas concentrações de antígeno e de anticorpo secundário e o soro nas diluições de 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600.

As análises estatísticas foram realizadas para comparar os valores de absorbância obtidos do grupo vacinado frente ao seu respectivo peptídeo e em relação ao KLH isolado e também em relação as médias do grupo controle. Foi utilizando o teste ANOVA, seguido pós-teste de múltipla comparação de Tukey com nível de 5% de probabilidade. Para as comparações entre os títulos de anticorpos no último dia de coleta, foi utilizado o test t entre os grupos. As análises foram feitas utilizando o software GraphPad Prism, versão 7.0.

3. Resultados

Foi possível verificar neste estudo que todos os peptídeos foram imunogênicos (Figura 1, 2 e 3). Na quinta coleta, ou seja, sete dias após a revacinação, foi observado um maior valor de ELISA para a IgG sérica anti-peptídeos nos camundongos vacinados.

O grupo vacinado com o peptídeo 3 alcançou uma média de absorbância 9.6 vezes maior do que quando testado frente apenas ao KLH (Figura 3) na coleta do dia 42. A média do grupo vacinado com o peptídeo 2 foi 6.2 vezes maior quando testado com o peptídeo do que com os grupos controles (Figura 2). E no grupo do peptídeo 1 a diferença maior foi visualizada quatorze dias depois da segunda dose da vacina, em que foi 3 vezes maior do que a média de absorbância do soro frente ao KLH (Figura 1).

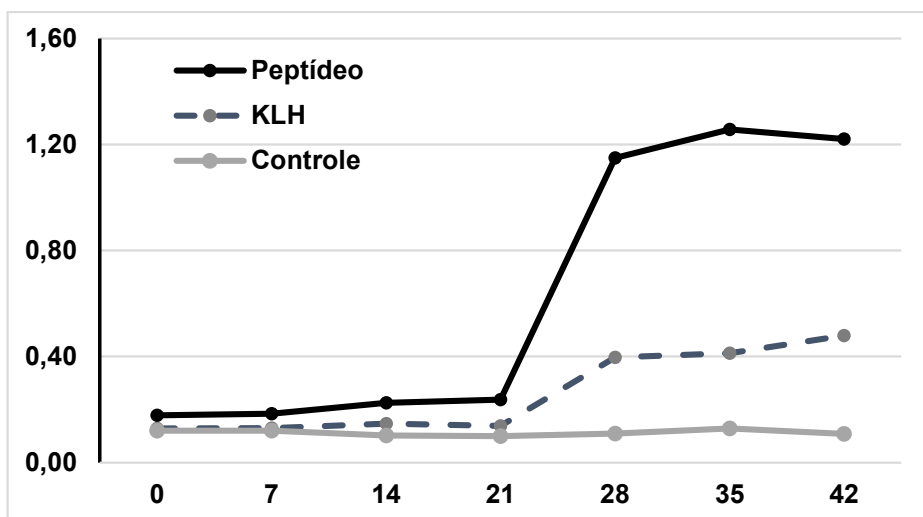


Figura 1: Médias de absorvância do soro de camundongos (IgG) imunizados com o peptídeo 1, KLH e controle pela técnica de ELISA indireta.

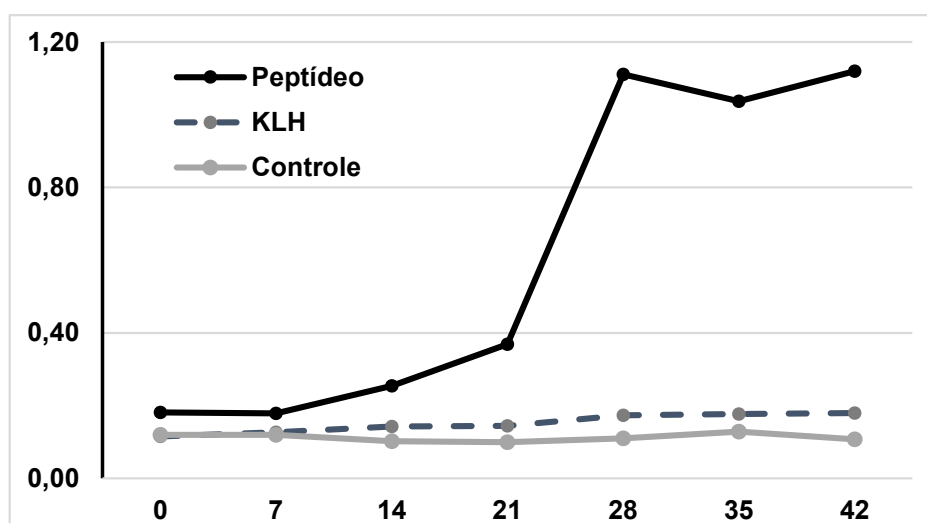


Figura 2: Médias de absorvância do soro de camundongos (IgG) imunizados com o peptídeo 2, KLH e controle pela técnica de ELISA indireta.

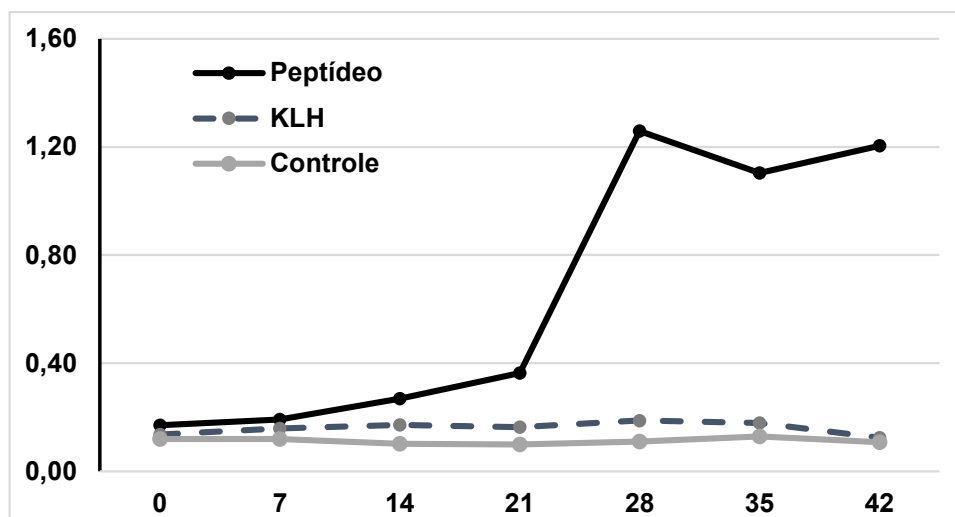


Figura 3: Médias de absorvância do soro de camundongos (IgG) imunizados com o peptídeo 3, KLH e controle pela técnica de ELISA indireta.

Na avaliação da titulação entre os grupos de animais vacinados com peptídeos, após os 21 dias da segunda dose da vacinação, verificou-se que todos os grupos mantiveram a mesma tendência decrescente de absorvância. Porém, valores de ELISA mais elevados foram observados no do peptídeo 2, que mesmo na menor diluição obteve média de absorvância de 0.613, sendo estatisticamente superior ($p < 0.05$) quando comparado com o peptídeo 3 (0.374) e o peptídeo 1 (0.277) que apresentou parâmetros estatisticamente iguais ao do controle (Figura 4).

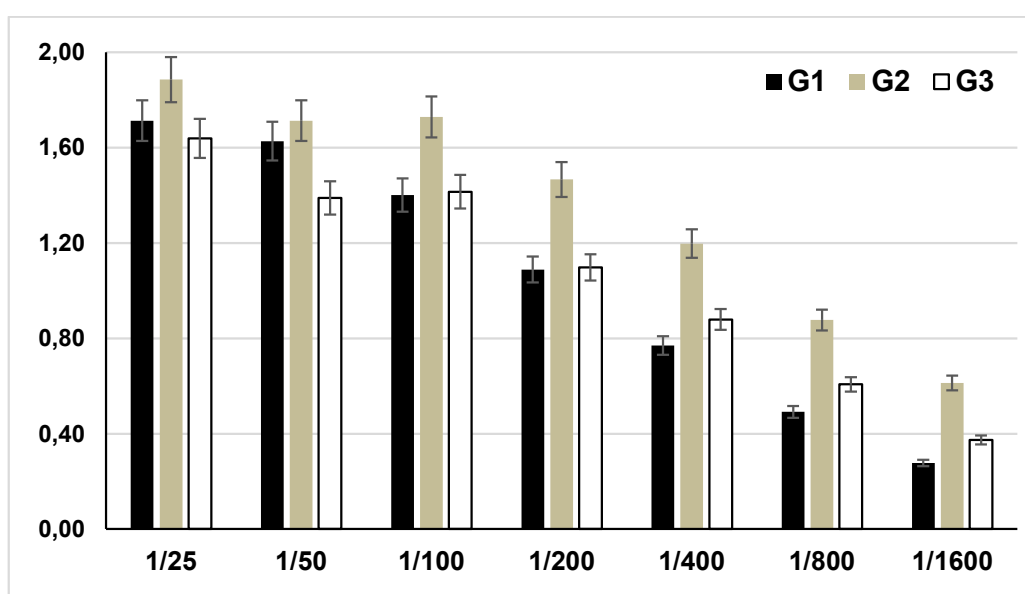


Figura 4: Comparação das médias da titulação do soro dos camundongos, 21 dias após a última imunização. Resultado dos três grupos imunizados e testados pela técnica de ELISA indireto.

4. Discussão

A caracterização da imunogenicidade dos peptídeos verificada pela quantificação de IgG, demonstra que estes são promissores para o desenvolvimento de uma nova vacina anti-*Haemonchus contortus*. Nos primórdios dos estudos para a imunização de ovinos contra este nematódeo, já se sabia que a resposta humoral era determinante para o sucesso de alternativas de controle imunológico. Smith *et al.* (1994) observaram que os parasitos da espécie *H. contortus* recuperados de ovinos vacinados com glicoproteínas deste mesmo nematódeo, possuíam o seu intestino recoberto por imunoglobulinas, o que sugeria uma interferência na absorção de nutrientes.

O adjuvante hidróxido de alumínio [Al(OH)₃] é utilizado para potencializar a resposta humoral ao peptídeo. Vervelde *et al.* (2003) constataram que existe correlação entre o aumento da produção de IgG contra antígenos glicano e a redução de OPG em cordeiros, principalmente quando a vacina possui adjuvante a base de alumínio. Este resultado possivelmente é explicado pela característica destes adjuvantes de modularem a resposta para Th-2 que direciona o sistema imune para o aumento da produção de imunoglobulinas.

Foi observado nos animais imunizados com o peptídeo 1 uma resposta maior ao carreador KLH isolado, quando comparado aos outros grupos. Sugere-se que a conformação deste peptídeo quando adicionado de KLH forme um epítopo que favorece o reconhecimento desta molécula. Oliveira e Ferreira (2006) pesquisaram a capacidade de células dendríticas (CDs) de induzirem a proliferação de linfócitos T em camundongos quando inoculados com a saliva do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. Nestes testes, foi possível constatar que a inoculação destas células estimuladas com a saliva juntamente com o KLH não foi diferente da resposta de camundongos inoculados com CDs apenas com KLH.

Assim como no presente estudo outros aminopeptídeos já foram testados para a proteção à infecção por *H. contortus*. O mais extensamente analisado foi o H11, que inclusive compõe a única vacina comercial para este nematódeo (SINGH *et al.*, 2019). A desvantagem desta vacina é a necessidade de cinco doses para o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz. Ao contrário desta vacina, os aminopeptídeos avaliados aqui, em modelo experimental murino, estimularam uma resposta humoral significativa já na segunda dose da imunização, destacando-se o peptídeo 2 que mesmo na menor diluição avaliada manteve a média de absorbância maior que o controle.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pecuária Sul [02.13.10.009.00.00], e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – [Código de Financiamento: 001].

5. Conclusão

Os três peptídeos testados, quando aplicados em duas doses, estimularam o aumento da produção de imunoglobulina G específicas em camundongos. Sendo potencialmente uma base promissora para o desenvolvimento de uma vacina para o controle da infecção de *Haemonchus contortus*.

6. Referências

- EMERY, D. L.; HUNT, P. W.; LE JAMBRE, L. F. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? **International Journal for Parasitology**, v. 46, n. 12, p. 755–769, nov. 2016.
- HEWITSON, J. P.; MAIZELS, R. M. Vaccination against helminth parasite infections. **Expert review of vaccines**, 13(4), 473-487. 2014.
- MOXON, R.; RECHE, P. A.; RAPPUOLI, R. Reverse Vaccinology. **Frontiers in Immunology**, 10. 2019.
- OLIVEIRA, C. J. F.; FERREIRA, B. R. **Saliva de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) modula a migração e função de células dendríticas**. 2006. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.
- RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology. **Current opinion in microbiology**, v. 3, n. 5, p. 445–450, 2000.
- SALGADO, J. A.; SANTOS, C. D. P. Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 25(1), 3-17, 2016.
- SINGH, E.; CHANDRA, D.; PRASAD, A.; KAUR, N. Potential Vaccine Candidates against Nematodes of Veterinary Importance: An Overview. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. 8(4), 222-228, 2019.
- SMITH, W. D.; SMITH, S. K.; MURRAY, J. M. Protection studies with integral membrane fractions of *Haemonchus contortus*. **Parasite Immunology**, v.16, p.231-241, 1994.
- VERVELDE, L.; BAKKER, N.; KOOYMAN, F. N.; CORNELISSEN, A. W.; BANK, C. M.; NYAME, A. K.; VAN DIE, I. Vaccination-induced protection of lambs against the parasitic nematode *Haemonchus contortus* correlates with high IgG antibody responses to the LDNF glycan antigen. **Glycobiology**, 13(11), 795-804. 2003.

6. Doutorado Sanduiche

Em setembro de 2019 ingressei no Programa de Doutorado Sanduiche no Exterior (PDSE - 88881.189499/2018-01), financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que me possibilitou realizar parte do meu doutorado em Edimburgo – Escócia. Iniciei as minhas atividades de pesquisa no Moredun Research Institute, sob orientação do Dr. David Bartley, buscando aprender e absorver o maior número de técnicas relacionadas ao controle de nematódeos gastrintestinais. Assim, estive inserida em diversos projetos que visavam o controle sustentável destes parasitos e a identificação e diminuição da resistência anti-helmíntica em ovinos, bovinos, suínos e veados.

Para o desenvolvimento no Moredun do estudo que compõem a minha tese de doutorado foi necessária a utilização de quatro diferentes espécies animais, sendo elas bovinos, suínos, caprinos e ovinos. Com estes animais a disposição, em locais com rigoroso controle da exposição a outras infecções, foi possível fazer a manutenção e a recuperações de cepas isoladas e caracterizadas de *Trichostrongylus* spp., *Haemonchus* spp., *Cooperia* spp., *Ostertagia* spp. e *Teladorsagia* spp., resistentes e suscetíveis frente a diferentes compostos químicos. Após estabelecida a monoinfecção foi realizada a confirmação através de sequenciamento de DNA de cada população. Todas as populações confirmadas foram então utilizadas para testes *in vitro* com *Saccharomyces cerevisiae*, com o qual havíamos iniciado os estudos no Brasil.

Realizei também a avaliação *in vivo* de estratégias sustentáveis de controle de parasitos para minimizar a pressão de seleção por resistência à lactona macrocíclica através do uso de protocolos de população de manutenção e observando o papel que veados podem desempenhar na disseminação de nematoides de ovinos e bovinos e de cepas resistentes à anti-helmínticos. Esta pesquisa exigiu controle semanal da população de pastagem com recolhimento de amostras e recuperação de larvas na fase de vida livre, acompanhamento semanal

da infecção parasitária com OPG individual coletando e analisando as fezes e avaliação do ganho de peso dos ovinos.

Particpei de avaliação *post-mortem* de conteúdo de abomaso, intestino delgado e intestino grosso de ovinos tratados com diferentes combinações de anti-helmínticos e seus controles. Sendo possível identificar os parasitos presentes, medir os exemplares fêmeas e contar seus ovos, e após comparar os resultados dos diferentes grupos.

Avaliei as espécies de nematódeos presentes em veados originários de Edimburgo/Reino Unido, através de PCR-RT utilizando o seu soro. Assim foi possível identificar e correlacionar espécies de parasitos presentes em veados e também em bovinos e ovinos. Este estudo epidemiológico é pioneiro ao entender a importância dos animais silvestres ao carrear populações de uma propriedade para a outra, visto que o número de cervídeos na Europa está em ascensão por causa da diminuição de sua caça, o mesmo que podemos observar no Brasil. Assim estes animais assumem grande importância na manutenção das populações de parasitos, podendo este resultado ser extrapolado para o Brasil. Este estudo já rendeu a primeira publicação em cooperação entre os laboratórios brasileiros e escoceses: "Use of Multiplexed Tandem PCR in a Scottish Deer Survey" com os seguintes autores, A. Morrison, M. Mitchell, Ross Bachetti L. Andrews, N. Berne Pinheiro J. Gilray, J. Thomson T. N. McNeilly, & D. Bartley.

Realizei ainda a infecção experimental de suínos com o nematódeo *Oesophagostomum* spp., com posterior tratamento dos animais, abate e recuperação dos parasitos adultos para contagem e identificação de cepas resistentes.

Produzi larvas de *Ostertagia* spp. para infecção de bovinos jovens através de dois doadores bovinos que foram mantidos estabulados. Após um número suficiente deste parasito foram infectados 12 bovinos que foram divididos em dois grupos com diferentes tratamentos anti-helmíntico e mais o grupo controle. Durante a infecção e tratamento os bovinos foram acompanhados quanto ao número de ovos nas fezes e o seu peso. Após foram abatidos e os parasitos recuperados para contagem e medição de suas fêmeas.

O período em que estive no Moredun Research Institute foi de extremo aprendizado. Acredito ser imensurável tudo que vivi, observando os mais

renomados pesquisadores da área de parasitologia tão de perto e todas as pesquisas realizadas me oportunizaram o aprendizado de técnicas parasitológicas e de técnicas moleculares de ponta. O grupo de pesquisa em que estive inserida neste período era grande, mas todas as pessoas não mediram esforços para me ajudar e me disponibilizar todos os equipamentos e estrutura que eles possuíam.

7. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii* quando administradas a ovinos possuem efeito benéfico para sua imunidade contra *Haemonchus contortus*. A melhora na resposta imune destes hospedeiros afeta diretamente na propagação do parasito *Haemonchus contortus*. Aliado a isto, três diferentes peptídeos selecionados do genoma de *H. contortus* se mostraram imunogênicos, sendo promissores para o desenvolvimento de uma vacina.

É necessário prosseguir com as pesquisas para testar a proteção dos peptídeos em ovinos infectados com *H. contortus*. E com isso, desenvolver uma vacina oral que seja formada com *Saccharomyces* spp. transformado com o peptídeo antigênico.

8. REFERÊNCIAS

- AMARANTE, AFT. ANTI-HELMÍNTICOS. IN: **OS PARASITAS DE OVINOS** [ONLINE]. SÃO PAULO: EDITORA UNESP, PP. 123-136. ISBN 978-85-68334-42-3. AVAILABLE FROM SCIELO BOOKS. 2014.
- AVILA, L. D. C.; DE LEON, P. M. M.; DE MOURA, M. Q.; BERNE, M. E. A.; SCAINI, C. J.; LEIVAS LEITE, F. P. Modulation of IL-12 and IFN γ by probiotic supplementation promotes protection against *Toxocara canis* infection in mice. **Parasite immunology**, 38(5), 326-330, 2016.
- BODDY, A.V.; ELMER, G.W.; MCFARLAND, L.V.; LEVY, R.H. Influence of antibiotics on the recovery and kinetics of *Saccharomyces boulardii* in rats. **Pharmaceutical Research**, v. 8, p. 796- 800, 1991.
- BRAGA, F. R.; FERRAZ, C. M.; DA SILVA, E. N.; DE ARAÚJO, J. V. Efficiency of the Bioverm® (*Duddingtonia flagrans*) fungal formulation to control in vivo and in vitro of *Haemonchus contortus* and *Strongyloides papillosus* in sheep. **3 Biotech**, 10(2), 62, 2020.
- CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; DURAND, H. Probiotics in animal nutrition and health. **Beneficial microbes**, 1(1), 3-9, 2009.
- DAS, S.; GUPTA, P. K.; DAS, R. R. Efficacy and safety of *Saccharomyces boulardii* in acute rotavirus diarrhea: double blind randomized controlled trial from a developing country. **Journal of tropical pediatrics**, 62(6), 464-470, 2016.
- DOS SANTOS, J. S.; DE FRANÇA, V. R.; VENANCIO, R. L.; HASEGAWA, P. H.; DE OLIVEIRA, A. G.; COSTA, G. A. N. β -Glucan from *Saccharomyces cerevisiae* in skim yogurt production. **Bioscience Journal**, 35(2), 2019.
- ELSE, K. J.; FINKELMAN, F. D. Invited review Intestinal nematode parasites, cytokines and effector mechanisms. **International journal for parasitology**, v. 28, n. 8, p. 1145-1158, 1998.
- EMERY, D.L.; HUNT, P.W.L. E.; JAMBRE, L.F. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? **International Journal for Parasitology**. 46, 755-769, 2016.
- ERZEN, N.K; KOLAR, L.; FLAJS, V.C.; KUZNER, J.; MARC, I.; POGACNIK, M. Degradation of abamectin and doramectin on sheep grazed pasture. **Ecotoxicity**, v. 14, p. 627-635, 2005.

FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; PINHO, O.; VIEIRA, E.; TAVARELA, J. G. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. **Trends in food science & technology**, 21(2), 77-84, 2010.

HARTWELL, L. H. *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. **Bacteriological reviews**, 38(2), 164, 1974.

JANEWAY C.A. Jr. How the immune system protects the host from infection. **Microbes Infection**. 3: 1167 - 71. 2001.

MAIZELS, R. M., & MCSORLEY, H. J. Regulation of the host immune system by helminth parasites. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 138(3), 666-675. 2016.

MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L. Resistência anti-helmíntica em nematóides de pequenos ruminantes: uma revisão. **Ciência Animal**, 12(1), 35, 2002.

MELO, A. C. F. L.; REIS, I. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; VIEIRA, L. D. S.; ECHEVARRIA, F. A. M.; MELO, L. M. Nematódeos resistentes a anti-helmíntico em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. **Embrapa Caprinos e Ovinos**-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2003.

MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L. Abordagem genética da resistência anti-helmíntica em *Haemonchus contortus* Genetic approach of anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, 100, 141-146, 2005.

MOLENTO, M. B.; VERÍSSIMO, C. J.; AMARANTE, A. T.; VAN WYK, J.; CHAGAS, A. C. S.; DE ARAÚJO, J. V.; BORGES, F. A.. Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Arquivos do Instituto Biológico**., São Paulo, 80(2), 253-263, 2013.

MOXON, R.; RECHE, P. A.; RAPPUOLI, R. Reverse Vaccinology. **Frontiers in Immunology**, 10. 2019.

NEUMANN, M.; HORST, E. H.; UENO, R. K.; LEÃO, G. F. M.; DE ALMEIDA, E. R.. Eficácia do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* no desempenho e características de carcaça de novilhos Canchim. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, 14, 177-184. 2016.

OELSCHLAEGGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions – a review. **International Journal of Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 300, p. 57 - 62, 2010.

PADILHA, T. Resíduos de anti-helmínticos na carne e leite. In: T. PADILHA, ed. **Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes**. Coronel Pacheco: EMBRAPA/CNPGL. pp. 77-93, 1996.

PAGE, A. P.; ROBERTS, M.; FÉLIX, M. A.; PICKARD, D.; PAGE, A.; WEIR, W. The golden death bacillus *Chryseobacterium nematophagum* is a novel matrix digesting pathogen of nematodes. **BMC biology**, 17(1), 10. 2019.

PASTORET, PP, GRIEBEL, P, BAZIN, H, GOVAERTS, A, 1998. **Immunology of Cattle**. In: **Handbook of Vertebrate Immunology**, Academic Press, San Diego, CA, pp. 439-484.

PERRIGOUÉ, J. G.; MARSHALL, F. A.; ARTIS, D. On the hunt for helminths: innate immune cells in the recognition and response to helminth parasites. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 9, p. 1757-1764, 2008.

PINTO, N. B.; DE CASTRO, L. M.; DE ALMEIDA CAPELLA, G.; MOTTA, T. O.; DE MOURA, M. Q.; BERNE, M. E. A.; LEITE, F. P. L. Controlling gastrointestinal nematodes in cattle by *Bacillus* species. **Veterinary parasitology**, 245, 1-4. 2017.

POSADA BUSTOS, S.; CHAMORRO, V.; FERNANDO, J. Probiotics in Acute, Antibiotic-associated and Nosocomial Diarrhea: Evidence in Pediatrics. **Revista Colombiana de Gastroenterologia**, 33(1), 41-48, 2018.

ROCHA, R.A.; AMARANTE, A.F.T.; BRICARELLO, P.A. Resistance of Santa Ines and Ile de France suckling lambs to gastrointestinal nematode infections. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 14, 17-20, 2005.

SALGADO, J.A.; SANTOS, C.P. Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 25, 3-17, 2016.

SINGH, E.; CHANDRA, D.; PRASAD, A.; KAUR, N. Potential Vaccine Candidates against Nematodes of Veterinary Importance: An Overview. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. 8(4), 222-228, 2019.

SINOTT, M. C.; CUNHA FILHO, N. A.; CASTRO, L. L. D.; LORENZON, L. B.; PINTO, N. B.; CAPELLA, G. A.; LEITE, F. P. L.. *Bacillus* spp. toxicity against *Haemonchus contortus* larvae in sheep fecal cultures. **Experimental parasitology**, 132(2), 103-108. 2012.

VAN DER AA KÜHLE, A.; SKOVGAARD, K.; JESPERSEN, L. In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. **International journal of food microbiology**, 101(1), 29-39, 2005.

ZAJAC, A. M. Gastrointestinal nematodes of small ruminants: life cycle, anthelmintics, and diagnosis. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, 22(3), 529-541, 2006.

9. ANEXOS

Anexo 1: Aprovação na Comissão de ética (CEUA/Embrapa) ovinos.

Pecuária Sul

**Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da
Embrapa Pecuária Sul**

Resolução

Protocolo Nº: 03/2017
Pesquisador Responsável: Alessandro Pelegrine Minho
Título do Projeto: Modulação do sistema imunológico para controle da haemoncose em ovinos

Parecer da CEUA	
Aprovado	X
Com Pendências	
Não aprovado	
Retirado ¹	

A CEUA da Embrapa Pecuária Sul, em sua reunião de 10/03/2017, emitiu o parecer referente a este Protocolo. Observar o parecer, no qual constam as orientações estabelecidas por esta Comissão.

Emanuelle Baldo Gaspar

Emanuelle Baldo Gaspar
Coordenador da CEUA

Bagé, 06 de abril de 2017 .

¹ O projeto não será executado e foi retirado da análise pela CEUA por solicitação do pesquisador.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro de Pesquisa Pecuária do Campos Sul-Brasileiros (Embrapa Pecuária Sul)
Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
Rodovia BR-153, Km 632,9, Vila Industrial, Zona Rural, Caixa Postal 242, CEP: 96401-970, Bagé, RS
Fone: +55 (53) 3240-4650 | Fax: +55 (53) 3240-4651
<https://www.embrapa.br/pecuaria-sul>

Anexo 2: Aprovação na Comissão de ética (CEEa/UFPeI) camundongos.

29/01/2020

SEI/UFPeI - 0137016 - Parecer



PARECER Nº
PROCESSO Nº
INTERESSADO:

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
49/2018/CEEa/REITORIA
 23110.011593/2018-25
 FABIO PEREIRA LEIVAS LEITE

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**DESENVOLVIMENTO DE INSUMOS IMUNOBIOLOGICOS PARA O CONTROLE DO *Haemonchus contortus* EM OVINOS**”, processo nº 23110.011593/2018-25, sob a responsabilidade de **Fábio Leivas Leite** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 07/05/2018.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	10/05/2018 a 15/08/2020
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> /Balb/c
Nº de animais	110
Idade	28 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central - UFPeI

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEa.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao *COBALTO* para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº CEEa 11593-2018).

Anexo 3: Comprovante de Aceite na Revista Beneficial Microbes

14/01/2020

Gmail - Beneficial Microbes - Decision on Manuscript ID BM-2019-07-0120.R1



Natália Berne Pinto <nbernevet@gmail.com>

Beneficial Microbes - Decision on Manuscript ID BM-2019-07-0120.R1

3 mensagens

Beneficial Microbes <onbehalf@manuscriptcentral.com>

3 de dezembro de 2019 13:22

Responder a: editor-in-chief@beneficialmicrobes.org

Para: nbernevet@gmail.com, emanuelle.gaspar@embrapa.br, alessandro.minho@embrapa.br, robert.domingues@embrapa.br, michele_m@yahoo.com.br, antonio.varela@furg.br, gabicapella@gmail.com, patricio.azevedo@hotmail.com, carolinemacielcosta@yahoo.com.br, fleivasleite@gmail.com

03-Dec-2019

Dear Dr. Pinto,

I am pleased to inform you that your manuscript entitled "*Saccharomyces cerevisiae* (YT001) supplementation for the control of *Haemonchus contortus* and modulation of the immune response of sheep" is accepted for publication in Beneficial Microbes, under condition that no problems arise during the editing stage at the publisher. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

I also would like to draw your attention to the possibility of publishing your manuscript as 'open access' for 1800 Euro in Beneficial Microbes. With open access, your article will be free available online for everyone. Open access publishing significantly increases the exposure and citation of your work. Often research grants have funding available for dissemination of the results of the research.

Note that that the publisher needs a signed Copyright Transfer Agreement (CTA) from the first or the corresponding author before the manuscript can be published. Please fax (+31 317 453417) or send the CTA by email to the publisher (bm@wageningenacademic.com) as soon as possible if you have not done already. For your convenience a blank CTA is attached to this email.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Beneficial Microbes, we look forward to your continued contributions to the Journal. Beneficial Microbes has an Impact Factor of 2.93 (2018 Journal Citation Report, Clarivate Analytics 2019).

Sincerely,

Dr. Koen Venema
Editor in Chief, Beneficial Microbes
editor-in-chief@beneficialmicrobes.org

Reviewer(s) Comments to Author:

Reviewer: 1

Comments to the Author

The manuscript has been certainly improved and I would recommend acceptance at this stage, providing you can modify a bit a couple of questions that can be addressed during the production process of the article:

- 1.- In the Abstract section, in line 16, instead of indicating the number of *S. cerevisiae* in this way (400 millions cfu/day), it would be more appropriate of using a power of ten indication (4×10^8 cfu/day).
 - 2.- In the Conclusion section, in line 14, *Saccharomyces cerevisiae* should go abbreviated (*S. cerevisiae*), and the code of the strain (YT001) should be included. That's very important because the benefits have been demonstrated for this particular strain, not in general for *S. cerevisiae*.
- Similarly, *Haemonchus contortus*, should appear abbreviated (*H. contortus*) in line 18.

Additional Section Editor Comments to Author:

Section Editor
Comments to the Author:
(There are no comments.)

* CTA-Beneficial-Microbes.doc
234K