

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Efeito imunomodulador do *Bacillus toyonensis* em equinos imunizados
com vacinas clostridiais recombinantes**

Mayara Caetano Abreu

Pelotas, 2024

Mayara Caetano Abreu

**Efeito imunomodulador do *Bacillus toyonensis* em equinos imunizados
com vacinas clostridiais recombinantes**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Professor Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

Coorientadora: Dra. Neida Lúcia Conrad

Pelotas, 2024

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

A162e Abreu, Mayara Caetano

Efeito imunomodulador do *Bacillus toyonensis* em equinos imunizados com vacinas clostridiais recombinantes [recurso eletrônico] / Mayara Caetano Abreu ; Fábio Pereira Leivas Leite, orientador ; Neida Conrad, coorientadora. — Pelotas, 2024.
71 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2024.

1. Tétano. 2. Imunopotencializador. 3. Citocinas. 4. Probiótico. 5. Vacinação. I. Leite, Fábio Pereira Leivas, orient. II. Conrad, Neida, coorient. III. Título.

CDD 636.10896079

Mayara Caetano Abreu

Efeito imunomodulador do *Bacillus toyonensis* em equinos imunizados com vacinas clostridiais recombinantes

Tese como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa:

03/04/2024

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (Orientador)

Doutor em Ciências Veterinárias pela University of Wisconsin Madison

Prof. Dr. Carlos Eduardo Nogueira

Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa

Maria Prof. Dr. Marcelo Lima

Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa

Maria Prof. Dra. Iusca Sampaio Finger

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Vitória Sequeira Gonçalves

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

**Dedico à todos os professores que me incentivaram nessa trajetória e à todos
os equinos que já tive e terei contato.**

Agradecimentos

À Deus, por todas as oportunidades que me trouxeram até aqui.

À minha família, pelo apoio, compreensão e investimento. Em especial minha irmã Isadora.

Aos colegas de laboratório, pelo suporte técnico e emocional, em especial a minha coorientadora Neida.

Ao meu orientador professor Fábio por toda paciência, motivação e ao carinho paternal que ele tem com os seus orientados.

Ao meu amigo Barbosa que me ajudou com os equinos desta vez e outras tantas vezes.

Aos meus amigos queridos pelo apoio e amizade.

À todos os professores e profissionais que me incentivaram, ensinaram.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

Resumo

ABREU, Mayara Caetano. **Efeito imunomodulador do *Bacillus toyonensis* em equinos imunizados com vacinas clostridiais recombinantes**. 2024. 73f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

Bacillus toyonensis é um probiótico esporulante, bactéria não patogênica, GRAM positiva, utilizado na suplementação animal. A suplementação com o *B. toyonensis* induz efeitos imunopotencializadores, aumentando a resposta vacinal em diferentes espécies, porém em equinos ainda não foi testado. O tétano e a hemoglobinúria bacilar são doenças causadas por clostrídios, produtoras de toxinas que causam alta taxa de mortalidade em equinos. Esse estudo avaliou o efeito da suplementação com o *B. toyonensis* na modulação da resposta imune em cavalos vacinados com vacinas recombinantes contra as toxinas do *Clostridium tetani* e do *Clostridium haemolyticum*. 20 equinos foram divididos em 2 grupos, com 10 animais cada, sendo eles: grupo 1, suplementados, com esporos viáveis de *B. toyonensis* (1×10^9); grupo 2 controle (placebo). Todos os grupos receberam seus respectivos tratamentos por 42 dias, iniciando 7 dias antes da primovacinação. Foram coletadas amostras de soro para avaliação da resposta imune humoral através de ELISA indireto e amostras de sangue total para a avaliação da transcrição de citocinas por qPCR pela proliferação celular nas células do sangue periférico. Resultados: níveis de IgG totais 3 vezes ($p < 0.05$) maiores (dia 35) no grupo suplementado contra o antígeno rTeNT, comparado ao grupo controle. Os níveis de anticorpos específicos anti-rTCHB ~2 vezes ($p < 0.05$) mais elevados do que os controles em todos os pontos estudados. Na titulação o grupo não suplementado obteve IgGs específicas até a diluição de 1:400, enquanto que o grupo suplementado chegou a 1:3200 anti-rTeNT, e grupo controle até 1:400, enquanto que o grupo suplementado 1:800 anti-rTCHB. O grupo suplementado apresentou níveis superiores de IgGa no dia 42 e de IgGT no dia 35 e 42 anti-rTeNT, e IgGa e IgGT a níveis significativos ($p < 0.05$) mais elevados (~1.5 vezes) dos que os controles, não tendo influência na IgGb anti-rTCHB. Na expressão relativa de citocinas o grupo suplementado, quando estimulados com o probiótico ~15 IL1, ~8,5 TNF- α , ~7 IL10 e ~6,5 de IL4. Na expressão relativa de citocinas o grupo suplementado quando estimuladas com o rTCHB a expressão relativa das citocinas IL1 e TNF α foram similares em ambos os grupos, entretanto a IL10 foi ~13 vezes superior no grupo suplementado e a IL4 não foi detectada transcrição. Conclusão: cavalos suplementados com o *B. toyonensis* obtiveram níveis de anticorpos maiores contra rTeNT e contra rTCHB. A suplementação proporcionou uma resposta celular e humoral do tipo mista Th1 e Th2.

Palavras-chave: tétano; citocinas; imunopotencializador; probiótico; vacinação.

Abstract

ABREU, Mayara Caetano. **The immunomodulatory effect of *Bacillus toyonensis* in horses immunized with recombinant clostridial vaccines**. 2024. 73p. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

Probiotic microorganisms can stimulate the immune response, enhancing vaccine efficiency. *Bacillus toyonensis* is a non-pathogenic, Gram-positive bacterium that has been used as a probiotic in animal supplementation. Supplementation with *B. toyonensis* induces immunomodulatory effects, increasing vaccine response indifferent species. This study evaluated the effect of supplementation with *B. toyonensis* on the modulation of the immune response in horses vaccinated with recombinant vaccines against toxins from *Clostridium tetani* and *Clostridium haemolyticum*. For this purpose, horses were divided into 2 groups: group 1, animals were orally supplemented for a period of 42 days with viable spores of *B. toyonensis* (1×10^8), starting 7 days before the primary vaccination; group 2 received only the placebo (40ml), the control group. Serum samples were collected to evaluate the humoral immune response using an indirect ELISA, and whole blood samples with sodium citrate were collected for cytokine transcription evaluation (qPCR) by cell proliferation in peripheral blood cells. Results: Total IgG levels were 3 times higher ($p < 0.05$) on day 35 in the supplemented group against the rTeNT antigen, compared to the control group. Specific anti-rTCHB antibody levels were approximately 2 times higher ($p < 0.05$) than controls at all points studied. In titration, the non-supplemented group obtained specific IgGs up to a dilution of 1:400, while the supplemented group reached 1:3200 anti-rTeNT, and the control group reached up to 1:400, while the supplemented group reached 1:800 anti-rTCHB. The supplemented group showed higher levels of IgGa on day 42 and IgGT on days 35 and 42 anti-rTeNT, and IgGa and IgGT at significantly higher levels ($p < 0.05$) (~1.5 times) than controls, with no influence on IgGb anti-rTCHB. In relative cytokine expression, the supplemented group, when stimulated with the probiotic, showed approximately 15 IL1, 8.5 TNF- α , 7 IL10, and 6.5 IL4. In relative cytokine expression, the supplemented group, when stimulated with rTCHB, the relative expression of IL1 and TNF α cytokines was similar in both groups, however, IL10 was approximately 13 times higher in the supplemented group, and IL4 transcription was not detected. Conclusion: Horses supplemented with *B. toyonensis* obtained higher antibody levels against rTeNT and rTCHB. Supplementation provided a mixed Th1 and Th2 cellular and humoral response.

Keywords: tetanus; cytokines; immunopotentiator; probiotic; vaccination;

Lista de Figuras

Capítulo 1. *Bacillus toyonensis* amplify the immunogenicity of an experimental recombinant vaccine against tetanus in horses

Figura 1 Presence of <i>B. toyonensis</i> BCT-7112 in the feces of supplemented horses.....	33
Figura 2 Levels of rTENT-specific total IgG.....	34
Figura 3 Titration of specific anti-rTENT total IgG.....	34
Figura 4 Assessment of specific anti-rTENT IgGa, IgGb and IgGT sub- isotype	35
Figura 5 Relative transcription of the cytokines IL1, IL4, IL10 and TNF- α	36

Capítulo 2. Humoral immune response in foals vaccinated with experimental recombinant tetanus vaccine

Figura 1 rTENT- specific antibody levels.....	47
Figura 2 IgGa, IgGb and IgGT isotypes and anti-rTENT specific total IgGs.....	48

Capítulo 3. *Bacillus toyonensis* supplementation amplify the vaccinal response to *Clostridium haemolyticum* recombinant experimental vaccine in equine

Figura 1 Kinetics of rTCHB-specific total IgG.....	57
Figura 2 Titration of specific anti-rTCHB total IgG.....	57
Figura 3 Assessment of specific anti-rTCHB IgGa, IgGb and IgGT sub- isotypes	58
Figura 4 Relative transcription of the cytokines IL1, IL4, IL10 and TNF- α	59

Lista de Tabelas

Capítulo 1. *Bacillus toyonensis* amplify the immunogenicity of an experimental recombinant vaccine against tetanus in horses

Tabela 1 Target genes and primers (5' to 3') used to determine gene transcription levels in PBMCs of vaccinated and control horses.....	32
---	----

Capítulo 3. *Bacillus toyonensis* supplementation amplify the vaccinal response to *Clostridium haemolyticum* recombinant experimental vaccine in equine

Tabela 1 Target genes and primers (5' to 3') used to determine gene transcription levels in PBMCs of vaccinated and control horses.....	56
---	----

Sumário

1 Introdução.....	13
2 Revisão da Literatura.....	15
3 Hipótese e Objetivos.....	25
4 Artigos	26
4.1 Artigo 1. <i>Bacillus toyonensis</i> amplify the immunogenicity of an experimental recombinant vaccine against tetanus in horses.....	27
4.2 Artigo 2. Humoral immune response in foals vaccinated with experimental recombinant tetanus vaccin.....	45
4.3 Artigo 3. <i>Bacillus toyonensis</i> supplementation amplify the vaccinal response to <i>Clostridium haemolyticum</i> recombinant experimental vaccine in equine.....	51
5 Considerações Finais.....	65
Referências.....	66
Anexo.....	69
Anexo A - Parecer de aprovação CEUA.....	70

1 Introdução

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, o número de cabeças do rebanho equino em 2022 é de 5.834.544 cabeças. A equideocultura movimenta anualmente R\$30 bilhões no Brasil, destacando a importância econômica desta espécie (IBEqui, 2023). Os imunobiológicos e antiparasitários representam a classe terapêutica mais comercializada no mercado veterinário, destacando a importância das vacinas, abrangendo 25% cada uma do mercado veterinário brasileiro (SINDAN, 2022).

As vacinas têm sido uma importante medida de profilaxia e controle das doenças infecciosas (Pollard e Bijker, 2021). As vacinas recombinantes vêm se destacando como uma alternativa promissora por terem o antígeno vacinal produzido de forma segura, tanto durante a produção quanto na inoculação na espécie alvo (Moreira et al., 2018). As vacinas de subunidade não são muito imunogênicas, por isso a necessidade de fatores que aumentem a magnitude e qualidade da resposta imunológica a elas (Aida et al., 2021). Objetivando ampliar a resposta a essas vacinas¹⁵ se estudam e se fazem uso de adjuvantes vacinais e probióticos.

Probióticos são microrganismos vivos que administrados em doses adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Diversos microrganismos apresentam efeito probiótico (Sanchez et al., 2015) dentre eles destaca-se o *Bacillus toyonensis* que tem demonstrado efeitos imunomoduladores. *Bacillus toyonensis* é uma bactéria Gram positiva, não patogênica e tem sido utilizada nas últimas décadas como probiótico na suplementação animal (Gil-Turnes e Conceição, 2007). A administração de *B. toyonensis* induz efeitos imunomoduladores com a capacidade de aumentar a eficácia das vacinas em diversas espécies (Santos et al., 2021; Roos et al., 2018; Franz et al., 2021).

Clostridium spp. possui distribuição mundial e sua capacidade patogênica é relacionada às toxinas produzidas por suas espécies (Popoff, Michel, 2020). O tétano afeta todos os mamíferos, mas a espécie equina apresenta maior sensibilidade (Hélène, Amory, 2011). A vacinação anual é recomendada já que os índices de letalidade são próximos a 75% (Magalhães, et al., 2016). *Clostridium tetani* possui 10

sorotipos e produz 3 toxinas, sendo a tetanoespasmina, a neurotoxina de importância clínica (Hélène, Amory, 2011). O *Clostridium haemolyticum* produz uma β -toxina que é endoteliotóxica e hepatotóxica, podendo estar ligada a lesões vasculares e hepáticas, apesar de pouco relatada nesta espécie, as taxas de mortalidade alcançam 95%, por ter um curto curso clínico (Navarro & Uzal, 2020). O tratamento da clostridiose varia dependendo da doença específica, mas pode envolver antibióticos, antitoxinas, intervenção cirúrgica e cuidados de suporte. Medidas de prevenção, como cuidados adequados com feridas, boas práticas de higiene e vacinação, sendo a vacinação o melhor método preventivo para ajudar a reduzir a incidência destas doenças (Lobato et al., 2013).

Este estudo objetiva avaliar a modulação da resposta vacinal humoral e celular em equinos suplementados com o probiótico *B. toyonensis* vacinados com bacterinas recombinantes contra a toxina de *Clostridium tetani* e contra a β toxina do *Clostridium haemolyticum*.

2 Revisão da Literatura

2.1 Probióticos

A primeira definição de probiótico foi definida por Metchnikoff, em 1908, que dizia que o consumo de produtos lácteos fermentados prolonga a vida. Da nomenclatura, na linguagem grega, probiótico significa “para a vida”. A definição aceita no meio científico é a de que probióticos são microrganismos vivos que administrados em doses adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). Em 2014, a Associação Científica Internacional de Probióticos (ISAPP) definiu como: microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício à saúde do hospedeiro. Dentre os efeitos benéficos destaca-se a modulação probiótica da imunidade (FAO, 2006).

Os probióticos são utilizados na saúde animal em diversas vertentes e por diferentes espécies (Zhong et al., 2022). Atuam principalmente no trato gastrointestinal (TGI) modulando funções intestinais (Hidalgo- Cantabrana et al., 2014), e por mecanismos de ação distintos que ainda não completamente esclarecidos (Yousefi et al., 2019). Os probióticos são capazes de estimular o sistema imune inato pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) (Medzhitov & Janeway Jr., 2000) e na imunidade adquirida, estimulando a produção de imunoglobulinas antígeno- específicas (Habil, 2015). As espécies bacterianas mais utilizadas em humanos e animais como probióticos são *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp. e *Bacillus* sp. (Yousefi et al., 2019).

Existem dois mecanismos principais de ações imunomoduladoras dos probióticos, pela regulação da expressão gênica e por vias de sinalização nas células hospedeiras, que são alcançadas pela estimulação de células imunes residentes no TGI, que resulta na atração de macrófagos e no aumento da fagocitose (Begum et al., 2021). Tal mecanismo de ação é baseado na modulação do sistema imunológico inato e adquirido do hospedeiro, através de seus metabólitos que são reconhecidos pelos receptores de reconhecimento conservados por células epiteliais intestinais (IECs) e células imunes associadas ao intestino, como as células imunes

efetoras de GALT que são constituídas principalmente por placas de Peyer, linfócitos e plasmócitos, cuja função principal é o monitoramento imunológico (Ding et al., 2021).

Células imunes neste local como as células Apresentadoras de Antígeno (APC) podem afetar diretamente as respostas mediadas por células M, linfócitos T, linfócitos B (Ding et al., 2021). As células M podem realizar o transporte das células bacterianas e seus produtos por transporte trans epitelial do lúmen intestinal para os tecidos linfoides (Yousefi et al., 2019). Tais células migram para os linfonodos mesentéricos, acessando a circulação sistêmica que estimulará a modulação imune tanto no local de origem, quanto sistemicamente (Lebeer et al., 2006). As respostas imunes sistêmicas se dão quando as APCs maduras estimuladas por antígenos migram para o linfonodo e diferenciam as células CD4⁺ Th0 virgens em subpopulações Th de acordo com o padrão de citocina secretada. As citocinas e células T diferenciadas vão migrar para o fígado e o baço, estimulando a produção de imunoglobulinas (Yousef et al., 2019).

O efeito imunomodulatório probiótico também se dá pela modulação da atividade enzimática alterando o metabolismo microbiano, a imunomodulação é um processo altamente complexo que resulta da interação entre o probiótico, microbiota intestinal, epitélio do trato gastrointestinal (TGI) e células imunes associadas ao TGI (Begum et al., 2021). A modulação imune mediada por probióticos tem sido demonstrada pelo aumento da capacidade fagocitária, proliferação de leucócitos, produção de anticorpos e alterações na expressão de toxinas (Erickson e Hublard, 2000). As ações do efeito benéfico dos probióticos podem agir na produção de antimicrobianos, por exclusão competitiva (bloqueando receptores ou no aumento do muco intestinal impedindo a adesão ao epitélio), por inibição ou inativação de toxinas bacterianas (Schoster, et al., 2014). Este efeito também é atribuído à liberação de citocinas fatores de necrose tumoral (TNFs), interferons (IFNs), fator de crescimento transformador (TGF) e quimiocinas que regulam o sistema imune inato e adaptativo (Foligné et al., 2010).

2.1.1 Suplementação probiótica em equinos

Equídeos possuem uma microbiota do trato gastrointestinal (TGI) superior (estômago, duodeno, jejuno) variável, dependente da forragem ambiental. A

microbiota do TGI posterior (ceco e cólon) mais estável, o que permite a utilização da forragem para uma nutrição ideal, tais microrganismos fornecem energia diária através da fermentação dos ácidos graxos de cadeia curta, qualquer alteração nesta microbiota pode causar alterações nos padrões fermentativos (Kauter et al., 2019).

Pesquisas utilizando probióticos vem sendo realizadas com o objetivo de otimizar a microbiota do TGI posterior equino, minimizando o impacto negativo das rações ricas em amido, promovendo a produção de lactato enquanto reduzem as bactérias celulolíticas fermentadoras de fibras (Langner et al., 2019), as quais podem causar distúrbios metabólicos, clinicamente se manifestando com laminite, colites e doença da grama (Kauter et al., 2019).

A maioria dos probióticos em equinos são microrganismos isolados de outras espécies (Kauter, et al., 2019). Estudos relatam o isolamento, em equinos saudáveis, das bactérias *Pediococcus acidilactici* e *Lactobacillus equi*, suplementaram camundongos com esses microrganismos e desafiaram com *Salmonella Typhimurium* (Pei, Lulu et al., 2020). E observaram a diminuição nas taxas de diarreia (*L. equi* 20%; *P. Acidilactici* 30%; Grupo controle 60%) e mortalidade (*L. equi* 0%; *P. acidilactici* 10%; Grupo controle 20%) demonstrando potencial para o tratamento de salmonelose (Pei, Lulu et al., 2020). Outras cepas autóctones também estão sendo estudadas, o *Enterococcus faecio* EF 412 apresentou potencial contra *Strongylus* spp. e contra *Eimeria* spp, além de tendência a estímulo fagocitário (Lauková et al., 2022).

Microrganismos do gênero *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Bifidobacterium* sp. e *Saccharomyces* sp. são consideradas probióticas em equinos (Kauter, et al.; 2019). Não existem muitos estudos com modulação probiótica em equinos, no estudo utilizando o *Saccharomyces cerevisiae* no terço final de éguas gestantes foi observado um aumento nas células mononucleares e nos níveis de TGF- β no colostro dessas éguas, mas sem alterações nos níveis de IgGs colostrais (Biaconi, 2019). Estudos utilizando cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis subesp. lactis* e *Lactobacillus paracasei subesp. paracasei* para uso tópico em ferida de equinos, observaram uma melhora de 50% da cicatrização após 12 dias de tratamento (Wilmink, J. M. et al., 2020).

Para obtermos os efeitos benéficos do microrganismo probiótico é muito importante a seleção da cepa bacteriana correta e o número de células viáveis para a dose estar adequada à espécie alvo (Markowiak e Slizewska, 2018). Em estudo

realizado pelo grupo de Berreta, et al. (2021), avaliou 11 apresentações de probióticos comerciais para equinos utilizando técnicas de cultura microbiológica e PCR e encontrou microrganismos não listados na fórmula, diferença entre os lotes testados e falta de 1 ou mais microrganismos presentes no rótulo, demonstrando que mais estudos são necessários a fim de determinar o efeito de probióticos em equinos.

2.1.2 *Bacillus toyonensis*

A utilização de *Bacillus* spp. como probiótico tem apresentado efeitos positivos como a influência na digestão, afetando processos de absorção e produzindo substâncias biologicamente ativas, incluindo vitaminas e enzimas, que atuam na inibição de espécies patogênicas, auxiliam na remoção de substâncias carcinogênicas e tóxicas, na diminuição do colesterol, da distensão gasosa e na modulação do sistema imunológico (Dimitrov et al., 2021). A esporulação do *B. toyonensis* é bastante vantajoso tanto na sobrevivência do microrganismo durante a passagem e na aderência à mucosa do TGI, quanto na facilitação da sua elaboração, no transporte e no armazenamento nas rações ou nas formulações utilizadas (Coppola e Gil Turnes, 2004).

Bacillus toyonensis que tem demonstrado efeitos imunomoduladores, a suplementação deste microrganismo tem demonstrado melhorar a eficácia da resposta vacinal em diversas espécies (Santos et al., 2021; Roos et al., 2018; Franz et al., 2021). Cães filhotes vacinados contra o parvovírus canino tipo 2 e suplementados com 2×10^8 de *B. toyonensis* a partir dos 45 dias de vida foram observados níveis séricos totais de IgG 4 vezes superiores ($P < 0,05$) ao grupo controle (Franz et al., 2021). Ainda, ovinos vacinados contra o Herpesvírus Bovino tipo 5 e suplementados com *B. toyonensis* ou *S. boulardii* evidenciaram um aumento significativo na soroconversão contra BoHV-5, nos títulos de anticorpos neutralizantes ($P > 0,05$) e nos níveis de transcrição de mRNA das citocinas IL-10 e IL-17A (Roos et al., 2010). Em estudos, realizados por Santos et al. em 2021, o qual testou o efeito imunomodulador da suplementação com *B. toyonensis* por 5 dias antes das doses vacinais, tanto com vacina recombinante experimental contra *Clostridium chauvoei* quanto com a vacina recombinante contra a toxina épsilon do *Clostridium perfringens*, foi observou aumentos significativos dos títulos de IgGs específicas, IgG1 e IgG2 nos

dias 21 e 42 do experimento comparados ao grupo controle sem suplementação, e aumento na transcrição de mRNA de citocinas, IL2, IFN γ e Bcl6 mais do que o grupo controle em ovinos, observando uma resposta mista Th1/Th2 modulada pelo *B. toyonensis* (Santos et al., 2021). Santos et al., 2021 observou que os níveis de anticorpos específicos aos antígenos testados nos ovinos suplementados, também foi maior a soroneutralização das toxinas, sugerindo uma correlação entre os IgGs totais e a neutralização.

2.2 Resposta imunológica em equinos

O sistema imunológico em equinos é responsável pela proteção do organismo contra doenças e infecções. Assim como em outros animais, o sistema imunológico dos equinos é composto por uma complexa rede de órgãos, células e moléculas que trabalham em conjunto para defender o corpo contra agentes patogênicos.

Inicialmente pelo sistema imunológico inato, presente em maior predominância nas mucosas, mantendo o mutualismo hospedeiro comensal. Além das barreiras mecânicas como as junções estreitas entre as células epiteliais intestinais, o muco produzido pelas células caliciformes, células hematopoiéticas, como as células mononucleares e as Células Linfoides Inatas (ILCs) (Claesson et al., 2010). As ILCs derivam da medula óssea, estando presentes nas mucosas do intestino e vias aéreas, agem rapidamente frente à patógenos, fazendo parte do sistema imune inato, são divididas em ILC1 (produzem IFN- γ , TNF- α), ILC2 (produzem IL-5, IL-12), ILC3 (produzem IL-22, IL-17), LTI (produzem linfotóxicas), células Natural Killers (NK), que produzem IFN- γ , TNF- α , perforinas e granzimas (Gabal-Vonaburg et al., 2020).

Os equinos possuem 11 isotipos de imunoglobulinas, são elas: IgM, IgD, IgA, IgE e IgG e 7 et al., 2008). A IgG é a imunoglobulina mais encontrada no soro equino, e desempenha importantes funções, como a neutralização de patógenos (Lewis et al., 2010). A IgM precede a IgG, e aparece precocemente na infecção aguda, participando da resposta imune primária mediada por anticorpos (Wagner et al., 2006). A IgE tem em menor quantidade no organismo e está envolvida em reação de hipersensibilidade tipo I e nas infecções parasitárias (Wagner et al., 2006). A IgA é a principal imunoglobulina de superfície de mucosa (Lewis et al., 2010). A IgD provavelmente possui baixa expressão e sua função não está esclarecida (Wagner et al., 2003).

Estudos funcionais e bioquímicos demonstraram diferenças na ativação do complemento, na ligação com o receptor Fc, e na capacidade de ligação às proteínas bacterianas entre os isotipos de IgG (Lewis et al., 2008). Estudos observaram que IgG4, IgG7 e possivelmente IgG1 protegem contra patógenos intracelulares (Soboel et al., 2011), enquanto que patógenos extracelulares a resposta seria de IgG3 e IgG5 600 (Mealey et al., 2012). As subclasses de IgG podem ser indicadores indiretos de respostas de linfócitos T e podem indicar resposta imune direcionada para o tipo linfócitos T auxiliares (ex. Th1, Th2, Treg, etc.) (Estes et al., 2002). Os isotipos IgGa (IgG1)1 e IgGb (IgG4/7) são atribuídas a capacidade de fixar complemento e mediar a citotoxicidade celular dependente de anticorpos, sendo a IgG T (IgG3/5) eficiente na neutralização de toxinas como as de *Clostridium* sp. (Lewis et al., 2008). A IgG3 é a subclasse com maior capacidade de desencadear explosão respiratória via ligação com receptores Fc (Lewis et al., 2008), e possui maior capacidade de neutralização de toxinas. A interação de probióticos com células intestinais epiteliais, células dendríticas e linfócitos (Bermudees-Brito et al., 2012) induzem uma modulação da resposta imune, inata e adaptativa, podendo aumentar a produção de citocinas polarizando as respostas dos linfócitos T auxiliares em Th1, Th2 e/ou Treg (Lebeer et al., 2010).

2.3 Antígenos vacinais utilizados

O gênero *Clostridium* possui mais de 60 espécies, são bastonetes Gram 629 positivos e desprovidos de cadeia respiratória, obrigatoriamente anaeróbios (Madigan et al., 2026). Algumas espécies deste gênero estão associadas à doenças de grande importância econômica em diversas espécies, tal capacidade patogênica está ligada à produção de toxinas destes microrganismos (Alouf et al., 2015). As clostridioses tem alta letalidade em equinos, apesar da prevalência variar de acordo com o agente (Farias et al., 2013). As principais espécies envolvidas na clostridioses em equinos são: *C. tetani* e *C. botulinum* (sintomas neurológicos); *C. chavoei*, *C. septicum*, *Paeniclostridium sordellii*, *C. novyi* tipo A e C, *C. perfringens* tipo A (mionecrosante); *C. perfringens* e *C. difficile* (doença entérica) (Junior & Ribeiro, 2015). *Clostridium haemolyticum* é um bastonete anaeróbico, que compartilha muitas características 639 biológicas com o *C. novyi* tipo B, por isso também é denominado de *C. novyi* tipo D,

característica que melhor os difere é a toxina TcnA produzida pelo *C. novyi* tipo B, mas não pelo *C. haemolyticum* (Navarro & Uzal, 2020).

A β -toxina produzida pelo *C. haemolyticum* é endoteliotóxica e hepatotóxica, promovendo trombose, necrose hepática, aumento dos líquidos intracavitários e lise dos eritrócitos podendo manifestar hemoglobinemia e hemoglobinúria (Navarro & Uzal, 2020). O diagnóstico geralmente é realizado pós morte, devido ao curso da doença, e pode ser feito pelo isolamento do microrganismo das lesões hepáticas, imunofluorescência, imunohistoquímica e por PCR (Lobato et al., 2013). Poucos relatos em equinos isolando o *C. haemolyticum*, foram reportados. Dentre eles, esse agente foi isolado relacionado a peritonite séptica e relacionado a hepatite necrótica envolvendo essa espécie (Hepworth et al., 2016) (Nyaoke et al., 2017). Em casos de hepatite, uma doença comum em bovinos, principalmente devido a migração da Fasciola hepática, e de espécies da família *Strongylidae* em equinos, gerando um ambiente hipóxico favorável à proliferação clostridial, onde também foi isolado o *C. haemolyticum* de equinos (Nyaoke et al., 2017; Davies et al., 2017). Cabe salientar a dificuldade no isolamento dos clostrídeos, tanto por serem microrganismos anaeróbios exigentes, quanto pela necessidade de preservação dos tecidos à serem analisados, sendo a identificação molecular por PCR uma alternativa valiosa como diagnóstico diferencial em doenças com apresentações clínicas neurológicas, toxêmicas, insuficiências hepáticas agudas e peritonites em equinos (Nyaoke et al., 2017). A endemia é favorecida pelo clima úmido, solo alcalino e mal drenado, a toxemia é de 661 curso rápido, de 24 até 36 horas, e de desfecho fatal na maioria dos casos, chegando 662 a taxa de 95% de mortalidade, o tratamento é realizado com altas doses de antibióticos à base de penicilina e tetraciclina, porém como o curso da doença é curto, 664 em geral não se tem sucesso (Lobato et al., 2013).

Clostridium tetani possui distribuição mundial, apresentando maior incidência em regiões quentes e úmidas, devido as melhores condições para esporulação do agente (Popoff, 2020). O tétano afeta mamíferos em geral, sendo a espécie equina a 668 mais sensível, a infecção acontece com esporos em lesões de continuidade 669 penetrantes profundas em condições de anaerobiose (Hélène, Amory, 2011). Na proliferação do *C. tetani* há a produção de tetanoespasmina, tetanolisina e uma toxina 671 não-espasmogênica. A tetanolisina amplia a necrose tissular local, promovendo a disseminação da infecção (Lima et al., 2013). A tetanolisina é uma toxina formadora de poros (Van Galen, 2017).

A tetanoespasmina se liga aos nervos sensitivos e motores, através da corrente circulatória até chegar ao sistema nervoso central (SNC), provocando a inibição de neurotransmissores (GABA e Glicina) das células de Renshaw, resultando na inibição de neurônios motores gama, nas junções neuromusculares e de gânglios autossômicos induzindo a hipertonia e espasmos musculares (Hélène, Amory, 2011). A TeNT é uma metaloprotease dependente de zinco, que quando absorvida se liga aos neurônios motores inibidores do SNC e impede a liberação dos neurotransmissores, conseqüentemente, provoca uma constante contração dos músculos (Van Galen, 2017). Clinicamente se observa espasticidade muscular constante e generalizada, hiperestesia, convulsões, rigidez, movimentos mandibulares restritos, membros ligeiramente separados, opistótono, cauda “bandeira”, orelhas eretas e direcionadas para trás, narinas dilatadas, ocorrendo acentuação por qualquer estímulo visual, táctil ou auditivo (Hélène, Amory, 2011).

O diagnóstico é baseado através do histórico, anamnese e dos sinais clínicos, é importante diferenciar de casos de intoxicações por metoclopramida, neurolépticos e estricnina (Lobato et al., 2013). O tratamento se preconiza o uso de soro antitetânico, antibióticos à base de penicilina, debridamento do local de infecção, uso de relaxantes musculares e tratamento de suporte (Hélène, Amory, 2011). O principal fator associado à sobrevivência foi a menor gravidade de sintomas (Pedroso, et al., 2012).

A vacina antitetânica faz parte da recomendação do Programa Nacional de Sanidade em Equídeos (PNSE) brasileiro juntamente com as vacinas contra a raiva, contra as encefalopatias e contra a Influenza. Na reunião da Associação Francesa de Veterinários de Equinos em Reims, (2016), foram elencadas 3 principais doenças infecciosas que acometem equinos: Influenza Equina, Rinopneumonite (herpesvirus tipo 1 e 4) e o tétano. No caso da doença causada pelo *C. tetani*, foi recomendada a vacinação anual e em casos de ferimentos e/ou cirurgias em que a última imunização datar de 6 meses ou mais, é preconizado uma dose de reforço, visando induzir uma resposta imune anamnésica. Em casos de animais não vacinados a recomendação é de vacinação emergencial e o uso do soro antitetânico, visando a neutralização da neurotoxina tetânica, destacando também a importância da detecção e desinfecção do local de infecção. Mesmo a vacinação contra o tétano sendo recomendada ela não é um procedimento padrão, o que eleva a mortalidade de 59% para 80% (Pedroso, et al., 2012).

No mercado brasileiro existem 6 tipos de vacinas disponíveis contra a toxina

tetânica, sendo duas somente contra a toxina tetânica e as outras se liga aos neurônios motores inibidores do SNC e impede a liberação dos neurotransmissores, consequentemente, provoca uma constante contração dos músculos (Van Galen, 2017). Clinicamente se observa espasticidade muscular constante e generalizada, hiperestesia, convulsões, rigidez, movimentos mandibulares restritos, membros ligeiramente separados, opistótono, cauda “bandeira”, orelhas eretas e direcionadas para trás, narinas dilatadas, ocorrendo acentuação por qualquer estímulo visual, tátil ou auditivo (Hélène, Amory, 2011).

O diagnóstico é baseado através do histórico, anamnese e dos sinais clínicos, é importante diferenciar de casos de intoxicações por metoclopramida, neurolépticos e estricnina (Lobato et al., 2013). O tratamento se preconiza o uso de soro antitetânico, antibióticos à base de penicilina, debridamento do local de infecção, uso de relaxantes musculares e tratamento de suporte (Hélène, Amory, 2011). O principal fator associado à sobrevivência foi a menor gravidade de sintomas (Pedroso, et al., 2012).

A vacina antitetânica faz parte da recomendação do Programa Nacional de Sanidade em Equídeos (PNSE) brasileiro juntamente com as vacinas contra a raiva, contra as encefalopatias e contra a Influenza. Na reunião da Associação Francesa de Veterinários de Equinos em Reims, (2016), foram elencadas 3 principais doenças infecciosas que acometem equinos: Influenza Equina, Rinopneumonite (herpesvirus tipo 1 e 4) e o tétano. No caso da doença causada pelo *C. tetani*, foi recomendada a vacinação anual e em casos de ferimentos e/ou cirurgias em que a última imunização datar de 6 meses ou mais, é preconizado uma dose de reforço, visando induzir uma resposta imune anamnésica. Em casos de animais não vacinados a recomendação é de vacinação emergencial e o uso do soro antitetânico, visando a neutralização da neurotoxina tetânica, destacando também a importância da detecção e desinfecção do local de infecção. Mesmo a vacinação contra o tétano sendo recomendada ela não é um procedimento padrão, o que eleva a mortalidade de 59% para 80% (Pedroso, et al., 2012).

No mercado brasileiro existem 6 tipos de vacinas disponíveis contra a toxina tetânica, sendo duas somente contra a toxina tetânica e as outras combinadas a outros agentes que também são de grande importância à equideocultura. Para as outras clostridioses que afetam equinos com exceção da vacina Linovac® que apresenta proteção contra as toxinas botulínicas C e D com indicação para equinos e bovinos, o restante das clostridioses não possuem vacinas indicadas para equinos, no entanto

há vacinas multivalentes contra clostridioses com indicações para bovinos, ovinos e caprinos.

3 Hipótese e Objetivos

A suplementação com *Bacillus toyonensis* modula a resposta vacinal em equinos.

3.1 Objetivo

Avaliar o efeito imunomodulador de *B. toyonensis* na resposta vacinal em equinos vacinados com vacina recombinante contra as toxinas do *Clostridium tetani* e *Clostridium haemolyticum*.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito imunomodulador do *B. toyonensis* em equinos; Avaliar se o período de 42 dias de suplementação com o *B. toyonensis* é bem tolerado por equinos;

Quantificar a presença do *B. toyonensis* nas fezes de equinos suplementados com o *B. toyonensis*;

Analisar os níveis de imunoglobulinas específicas das vacinas realizadas no grupo suplementado com o *B. toyonensis*;

Quantificar a modulação na expressão relativa das citocinas no grupo suplementado com o *B. toyonensis*.

4 Artigos

4.1 Artigo 1

***Bacillus toyonensis* amplify the immunogenicity of an experimental
recombinant vaccine against tetanus in horses**

Mayara Caetano Abreu, Neida Lucia Conrad, Vitória Sequeira Gonçalves, Fábio
Pereira Leivas Leite

Publicado na revista Journal of Equine Veterinary Science

***Bacillus toyonensis* amplify the immunogenicity of an experimental recombinant vaccine against tetanus in horses**

Mayara Caetano Abreu ^a, Neida Lucia Conrad ^b, Vitória Sequeira Gonçalves ^b, Fábio Pereira Leivas Leite ^{a,b*}

^a Departament of Veterinary Medicine, Federal University of Pelotas, UFPel, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Center for Technological Development, Biotechnology, Federal University of Pelotas, UFPel, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brazil

*Corresponding author: Address: Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, Prédio 19, zip code: 96010-900, Capão do Leão, RS, Brazil. Fax: +55 53 32757594. Fone: +55 53 991276663, fleivasleite@gmail.com

Abstract

Probiotic microorganisms can stimulate the immune response, increasing the efficiency of vaccine. *Bacillus toyonensis* is a non-pathogenic Gram-positive bacterium and has been used as probiotic in animal supplementation. The administration of *B. toyonensis* induces immunomodulatory effects, increasing vaccine responses in several species. This study aims to evaluate the effect of supplementation with *B. toyonensis* on the modulation of the immune response in horses vaccinated with a recombinant *Clostridium tetani* toxin. For this, horses were vaccinated twice with an interval of 21 days between doses. The horses were divided into two groups: group 1) the animals were supplemented orally, for a period of 42 days, with viable spores of *B. toyonensis* (1×10^8) mixed with molasses (40 ml), starting 7 days before the first vaccination; group 2) received only molasses, starting 7 days before the first vaccination, without the probiotic (control group). Serum samples were collected to evaluate the humoral immune response using in-house indirect ELISA and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected to evaluate cytokine transcription (qPCR). Evaluating the specific IgG-anti-rTENT titer, a significant ($p < 0.05$) four folds higher ELISA values, was observed in supplemented group, comparing with non-supplemented group. Also, the supplemented group showed higher ELISA values of sub-isotypes IgGa and IgGT, comparing with non-supplemented group.

In PBMCs stimulated with *B. toyonensis* relative cytokine transcription, of supplemented group showed a 15-, 8-, 7- and 6-folds increase for *IL1*, *TNF α* , *IL10* and *IL4* respectively, whereas when stimulated with vaccine antigen a 1.6, 1.8- and .5-fold increase for *IL1*, *TNF α* , and *IL4* respectively comparing with control group. Horses supplemented with *B. toyonensis* had a significant better vaccine immune response than controls, been a promising approach to be use improving vaccine efficacy.

Keywords: probiotic supplementation; horse vaccination; immunomodulation; vaccine response.

1. Introduction

Vaccines have been an important measure for the prophylaxis and control of infectious diseases [1]. Recombinant vaccines have stood out as a promising alternative, principally because vaccine antigen is safer, during production and during its use into the target species [2]. As a disadvantage, they are less immunogenic, which is why alternatives are being sought to increase vaccine efficacy.

Probiotics are a promising alternative to improve the effectiveness of vaccines, principally those based on recombinant antigens [3,4]. Probiotics are live microorganisms that, when administered in adequate doses, provide health benefits to the host (FAO/WHO, 2002). Several microorganisms have a probiotic effect [5], among which *Bacillus toyonensis* stands out, which has demonstrated immunomodulatory effects. *B. toyonensis* is a Gram-positive, sporulating, non-pathogenic bacterium that has been used in recent decades as a probiotic in animal supplementation [6]. The administration of *B. toyonensis* induces immunomodulatory effects with the ability to increase the effectiveness of vaccines in several species [7–9]

Tetanus is among the main infections that affect horses. Tetanus is a worldwide disease [10] that affects all mammals, with the equine species being the most sensitive [11]. Vaccination against tetanus is recommended, since fatality rates in horses are close to 75% [12]. *Clostridium tetani* produces 3 toxins, with tetanospasmin being the neurotoxin of clinical importance [11]. Available vaccines against tetanus are produced through the inactivation of tetanus toxin with formaldehyde, such preparation generates biosafety risks and laborious cultivation and inactivation processes [13]. Aiming to minimize such risks of traditional methods, recombinant antigens have been explored as a promising alternative in the use of vaccines [2].

Knowing that recombinant vaccines are less immunogenic, probiotics can be a valuable alternative to increase the immunogenicity of these vaccines. This study aims to evaluate the modulation of the probiotic *B. toyonensis* in the immune response of horses vaccinated with an experimental recombinant vaccine against *Clostridium tetani* toxin.

2. Material and methods

2.1 Probiotic culture

Bacillus toyonensis strain (BCT-7112) was recovered from the microorganism collection of the Microbiology laboratory, at the UFPel Biotechnology Center. *B. toyonensis* preparations were made as previously described by Santos et al. (2018) [14]. The daily amount of probiotic supplied to the horses was 4×10^9 CFU of *B. toyonensis* diluted in molasses (ALIMEL- Supra®- Lot 158613, pH ~6.0) in a 3:1 ratio. The probiotic-molasses solution (40 ml) was added to 500 g of commercial feed and offered individually to the animals, with the aim of increasing palatability.

2.2 Vaccine production

The recombinant tetanus vaccine, composed by 400 µg of recombinant Tetanus toxin N-terminal (rTeNT) adsorbed in 10% Aluminum Hydroxide (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), was provided by the Applied Immunology laboratory CDTec/UFPel, produced according to the protocol described by Moreira JR et al. (2016) [15] with some modifications. Briefly, *Escherichia coli* BL21 (DE3) strain Star were transformed with the recombinant vector pAE/TeNT. Transformed bacteria were grown in Luria-Bertani (LB) broth (37 °C, 150 RPM) supplemented with ampicillin (100 mg/mL). When the culture reached OD₆₀₀ 0.6-0.8, the expression was induced with IPTG (0.5 mM) for 3 h at 37 °C, 150 RPM. *E. coli* cells were harvested post-rTeNT protein expression by centrifugation (10,000 x g, 15 min, 4°C), suspended in lysis buffer (0.2 M NaH₂PO₄, 0.5 M NaCl, 10 mM imidazole), and incubated with 50 µg/mL of lysozyme for 1 h at room temperature. The cells were then disrupted by sonication and centrifuged (10,000 x g, 30 min, 4°C). The inclusion body pellets were washed three times with lysis buffer and incubated overnight at 4°C with lysis buffer supplemented with 8M urea, followed by centrifugation (10,000 x g, 30 min, 4°C). Recombinant proteins were purified by affinity chromatography using HisTrap™ HP 1 ml columns Ni Sepharose™ on the ÄKTAprime™ automated liquid chromatography system. Purified fractions were dialyzed against lysis buffer (pH 7.0) with 0.05% (v/v) Triton X-100 overnight. Protein

quantification was performed using the BCA Protein Assay (Pierce), and the purity and integrity of the recombinant antigens were evaluated by 12% SDS-PAGE.

2.3 Ethical Statement

All experiments were carried out in accordance with the recommendations of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA). The protocols were reviewed and approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation – CEEA/UFPel (CEEA 6729-2021).

2.4 Experimental design

Twenty healthy horses of no defined breed, gelding, and mares with no history of tetanus vaccination were used. The horses were divided into 2 groups, containing 10 animals each: Group 1. Supplemented daily with *B. toyonensis*; Group 2. Not Supplemented. Supplementation was carried out for 42 continuous days, starting 7 days before the primary vaccination, and maintained until day 35 of the experiment. All animals were vaccinated, intramuscularly with two doses (2ml) of a recombinant tetanus toxin vaccine on days 0 and 21 of the experiment. Blood samples were collected by jugular venipuncture on days 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 64 and 84. The experimental design can be viewed in the graphical abstract. The animals were monitored daily for body temperature, respiratory rate through auscultation, and hematological parameters weekly (blood count and dosage of the enzymes Gamma Glutamyl Transferase, Aspartate Dehydrogenase, Alkaline Phosphatase and Creatinine).

2.5 Presence of *B. toyonensis* in animal feces

To analyze the transit time and quantify the concentration of *B. toyonensis* eliminated by the supplemented group of horses, fecal samples were collected directly from the rectal ampoule, daily, during the 42 days of supplementation, as well as in the period of 20 days after the end of supplementation. After collection, the samples were stored at 4 °C until analysis. The samples were subjected to heat treatment (86 °C for 15 min) to inhibit the growth of vegetative cells and contaminants [16]. After heat treatment, logarithmic dilutions (base 2) were made and samples spreading into Brain Infusion Heart (BHI; Neogen, Lansing, MI, USA) agar plates. The plates were incubated at 37 °C for 24h, then colony counting (CFU) was evaluated. The identity of the microorganism was confirmed through biochemical tests.

2.6 Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

An in-house indirect enzyme linked immunoassay (ELISA) was used to evaluate the dynamics of specific anti-rTENT- IgG. Briefly, plates were coated overnight at 4 °C with 0.2 µg of purified rTENT diluted in carbonate-bicarbonate buffer (0.05M pH 9.6). To evaluate the total IgG response throughout the experiment, sera were analyzed individually, diluted 1:100 in phosphate-buffered saline (PBS) and added in triplicate to previously sensitized plates. To establish the optimal concentration of antigen to coating plates as well as the optimal serum dilution to be tested, different concentrations of rTENT and different control serum concentrations were screened in checkerboard titrations. To total IgG titration the pooled serum samples from day 35 were diluted in base 2, starting at 1:100 and increasing to 1:12800. The cut-off was determined as the mean absorbance of the groups at day 0 plus 2 standards deviations. For the IgG subtypes, a Monoclonal Antibody Isotyping Reagents kit (Bio-Rad, Brazil, São Paulo, SP), was used following the same protocol above describe. A monoclonal mouse anti-horse IgGa (IgG1) (clone CVS48) and IgGb (IgG4-7) (clone CVS39) and a polyclonal goat anti-horse IgG(T) (IgG3-5) (AAI38) (Bio-Rad, Brazil, São Paulo, SP) were used. With serum diluted 1/100 in PBS-T and a polyvalent peroxidase conjugated anti-horse IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, US) was diluted 1/6,000. Reactions were visualized with ortho-phenylenediamine (OPD, Sigma-Aldrich) stopped with 2 N H₂SO₄. The absorbance values were measured in an EZ Read 400 microplate reader (Biochrom®) with a 492 nm filter.

2.7 PBMCs isolation, RNA isolation, cDNA synthesis and qPCR

To evaluate cytokine transcription, 10 ml of blood was collected from each horse by jugular venipuncture, with a “vacuntainer BD®” needle in tubes with 0.38% Sodium Citrate. Equine blood was centrifuged (Sorvall centrifuge® RC-6 plus (Langenselbold, Germany) at 500 × g for 30 min to isolate and collect white blood cells (PBMCs) as previously described by Leite et al. (2004) [17]. Then, two pools of cells from 5 horses each was used. Briefly, 5 × 10⁷ cells were cultured in 24-well plates (Kasvi, China) containing 1 ml of RPMI 1640 medium (Gibco, USA) with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco), 10,000 IU/ml of penicillin, 10 mg/ml streptomycin and 25 mg/ml amphotericin B (Gibco) for 24 h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. PBMCs were stimulated with 10µg/ml concanavalin A (ConcA, Sigma-Aldrich®), RPMI 1640, *Bacillus toyonensis* (10⁶ UFC), and rTENT (10µg/well). ConcA and RPMI 1640 will serve as positive and

negative controls, respectively. After the incubation period, the supernatant was discarded, and the cells were collected in TRIzol® (Sigma-Aldrich®). RNA was extracted by the TRIzol method according to the manufacturer's instructions.

For cDNA synthesis and qPCR, 400 ng of RNA was used for cDNA synthesis, the reaction was carried out according to the instructions of the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). qPCR reactions were performed with 1 µl of cDNA, 5 µl of GoTaq® qPCR, 0.25 of each primer oligomer (Table 1) and 3.5 µl of RNase-free water, being carried out on the CFX96/BioRad® qPCR platform system. The mRNA transcription of the cytokines *IL1*, *IL4*, *IL10* and *TNF-α* was evaluated, where *B-gus* were used as reference genes. All samples were analyzed in triplicate. From the Threshold Cycle (Ct) values obtained, the relative transcription of the genes was calculated by comparison with the transcription of *B-gus*, according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [18]. Relative transcription fold increase levels were calculated by comparing threshold cycle (Ct) values of targeted genes with the Ct from cells from the same group incubated with culture media (controls).

Table 1. Target genes and primers (5' to 3') used to determine gene transcription levels in PBMCs of vaccinated and control horses.

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>IL1</i>	TGTACCTGTGTTGTGGGATTGAAAG	GCTTTTCCATTTTCCTCTTTGGGTAA
<i>IL4</i>	TGGCCCGAAGAACACAGATG	CTTGAGGTTCTGTCCCAGTC
<i>IL10</i>	GTCATCGATTTCTGCCCTGT	GCTTCGTTCCCTAGGATGC
<i>TNF-α</i>	TTACCGAATGCCTTCCAGTC	GGGCTACAGGCTTGTCACCTT
<i>B-gus</i>	GACATCCGAGGGAAGGGCT	AGCCAACGAAGCAGGTTGA

2.8 Statistical analysis

Statistical evaluation was performed with GraphPad Prism v7. Two-Way ANOVA was performed to analysis of variance followed by SIDAK for multiple comparison tests. Significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Clinical effect of *B. toyonensis* supplementation

Supplementation with *B. toyonensis* BCT-7112 in horses did not cause undesirable physiological changes, such as dysbiosis, diarrhea or inappetence. During the 42-day period of supplementation no adverse effects were observed on the respiratory rate, body temperature, as well as on the hematological parameters of the supplemented horses.

3.2 Detection of *B. toyonensis* in the feces of supplemented animals

B. toyonensis BCT-7112 was isolated from feces from the third day of supplementation maintaining an average concentration of 3.5×10^4 CFU/g until the end of the supplementation period (42 days). After interrupting supplementation, *B. toyonensis* was detected up to 14 days after suspension (Figure 1).

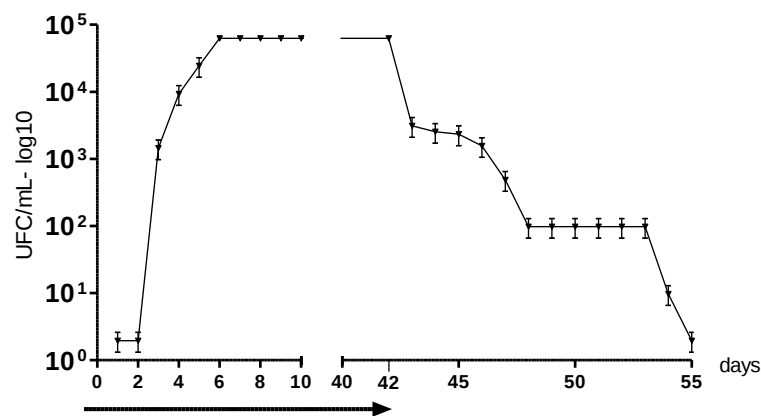
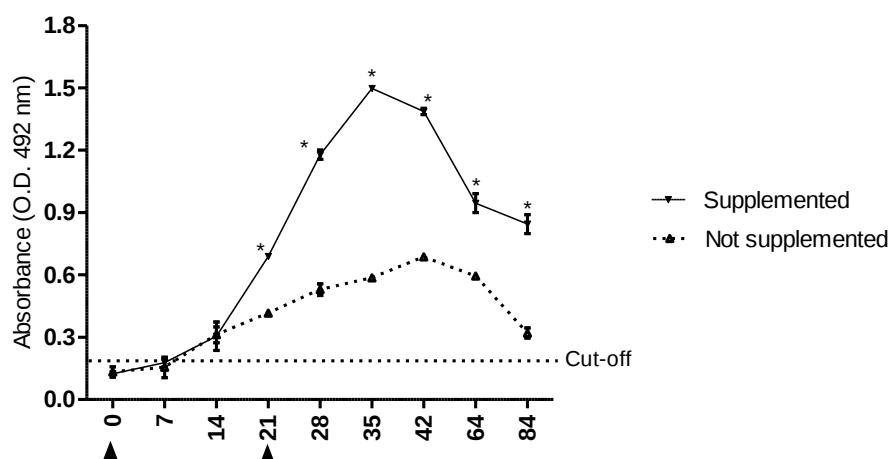


Figure 1. Presence of *B. toyonensis* BCT-7112 in the feces of supplemented horses. Count of colony-forming units per g (CFU/g) of *B. toyonensis* in the feces of supplemented and control horses. Supplementation occurred from day 0 to day 42 as indicated by the arrow. The evaluation was carried during the experimental period, and 20 days after the end of supplementation.

3.3 Dynamic of antibodies response

Animals supplemented and not supplemented with *B. toyonensis* showed an increase in the ELISA values (OD_{492nm}) of anti-rTENT antibodies (IgG) in response to vaccination from day 14 onwards. The supplemented animals showed IgG ELISA values, at 21 days post prime vaccination, ~2 times higher than the non-supplemented group ($p < 0.05$), with the higher ELISA values maintained until the end of the experimental period (Figure 2). At 28 days of the experiment (seven days after the second dose) supplemented animals showed IgG ELISA values ~3 times higher ($p < 0.05$) than not supplemented

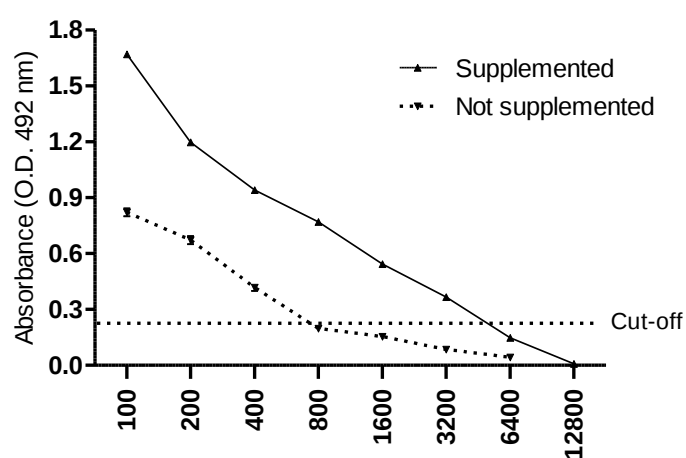
group. The highest ELISA values of antibodies in the supplemented group was observed on day 35 (~1.4 O.D absorbance), while in the non-supplemented group the highest ELISA values was observed on day 42 (~0.7 O.D absorbance) (Figure 2).



215

Figure 2. Levels of rTENT-specific total IgG. The data represent the mean (+/- SEM) of the ELISA values obtained in the analysis of individual sera in anti-rTENT specific IgG absorbance in supplemented and non-supplemented animals. Arrow heads indicate vaccination dates. Asterisk (*) represents the statistical difference ($p < 0.05$) between the supplemented and non-supplemented groups, evaluated by Two-Way ANOVA followed by SIDAK for multiple comparison tests.

In the titration of specific antibodies against rTENT on day 35 of the experiment, it was observed by ELISA values that the supplemented group presented titers of 3200 while the controls (not supplemented) obtained titers of 400 (Figure 3).



225

Figure 3. Titration of specific anti-rTENT total IgG. The data represent the means of anti-rTENT specific IgG ELISA values in pooled sera from supplemented and non-supplemented animals on day 35 of the experiment.

In the characterization of IgG sub-isotypes, the levels of IgGa and IgGT were higher ($p<0.05$) in the supplemented group, on days 35 and 42 ($p<0.05$). In contrast, IgGb did not show a different level between the groups (Figure 4).

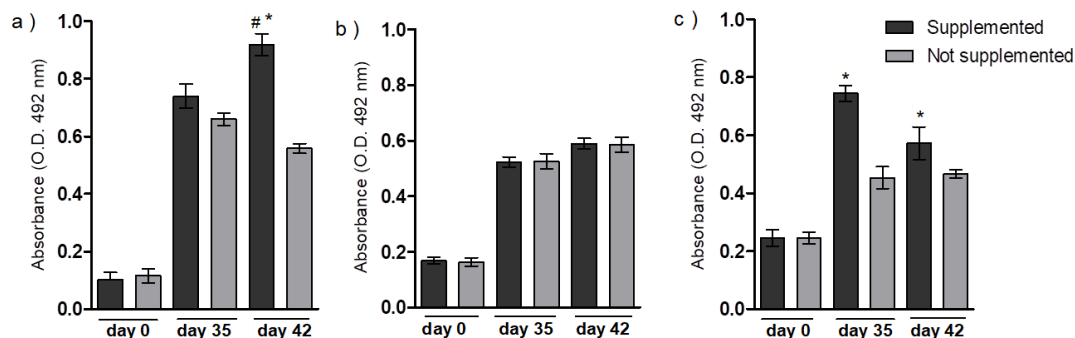


Figure 4. Assessment of specific anti-rTENT IgGa, IgGb and IgGT sub-isotypes. The data represent the means ($\pm$ SEM) of the absorbance values of the anti-rTENT specific IgG sub-isotypes in two pooled sera from each group supplemented and non-supplemented. Being (a) the IgGa sub-isotype, (b) IgGb sub-isotype and (c) the IgGT sub-isotype. Asterisk (*) represents the statistical difference (SIDAK, $p<0.05$) between the supplemented and non-supplemented group, on experimental days 35 and 42 and (#) represent statistical difference in IgGa between day 35 and day 42 in the supplemented group.

3.4 Cytokine response

Supplemented group PBMCs stimulated with *B. toyonensis* BCT-7112 showed significantly higher ($p<0.05$) mRNA transcription levels of *IL1* (~14.5-fold), *IL4* (~6.5-fold), *IL10* (~7.0), *TNF- α* , (~8.5 times) comparing with the cells incubated with culture media, than non-supplemented animals (Figure 5A). Supplemented group PBMCs stimulated with rTENT showed significantly higher ($p<0.05$) mRNA transcription levels of *IL1* (~3-fold), *IL4* (~5-fold) and *TNF- α* , (~4 times) than non-supplemented animals (Figure 5B). Note worth was rTENT stimuli induce less transcription in the PBMCs than *B. toyonensis*, with no detected *IL10* transcription (Figure 5). All cytokines evaluated in

the present study respond with significant ($p < 0.05$) higher relative transcription expression in PBMCs from *B. toyonensis* supplemented horses stimulated with ConcA, whereas the same stimuli in the cells from non-supplemented control horses was kept at base level (Figure 5C).

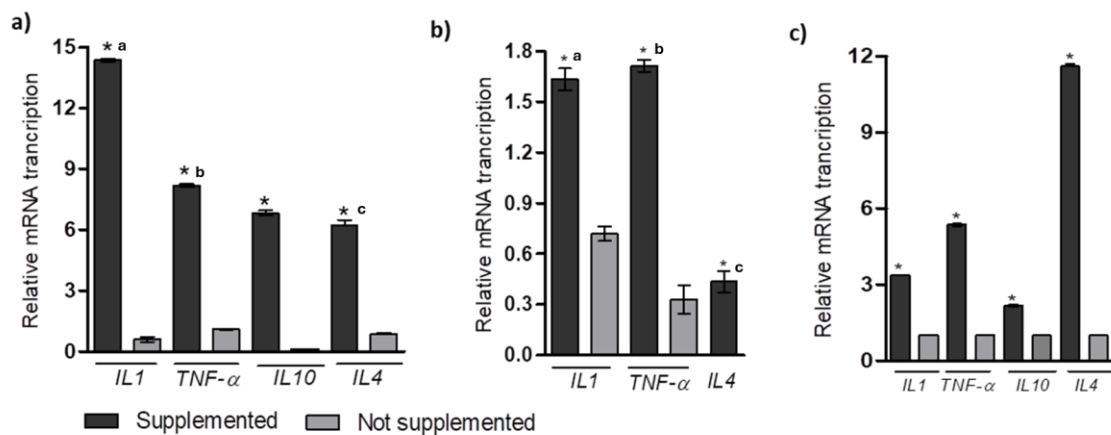


Figure 5. Relative transcription of the cytokines *IL1*, *IL4*, *IL10* and *TNF- α* . Data represent individual means ($\pm$ SEM) of cytokine transcription in PBMCs stimulated with *B. toyonensis* BCT-7112 (a), recombinant antigen – rTENT (b) and ConcA (c) in the supplemented and non-supplemented group on day 37 of the experiment. The cells from supplemented and not supplemented group incubated with media was used as a control parameter. Asterisks (***) represent statistical difference ($p < 0.001$) represent significant of cytokine transcription in PBMCs from supplemented and not supplemented group stimulated with *B. toyonensis* BCT-7112, and recombinant antigen – rTENT. Lowercase letters represent statistical difference ($p < 0.05$) between cytokine transcription between both stimuli (*B. toyonensis* and rTENT) by Two-Way ANOVA followed by SIDAK for multiple comparison tests.

4. Discussion

Supplementation with *B. toyonensis* BCT-7112 has proven to be a promising option for increasing the effectiveness of the vaccine response, especially considering vaccines with recombinant antigens [7]. During the experimental period, no adverse effects were observed from supplementation with *B. toyonensis* BCT-7112. These results are similar to those observed in studies carried out by our group with *B. toyonensis* in other species (e.g., sheep, pigs, and dogs) [7,9,14]. However, our findings differ from

those reported by Mair-Jenkins et al., (2015)[19], who reported a tendency to diarrhea in foals supplemented with *B. toyonensis*.

In the present study, we observed the immunomodulatory effect of *B. toyonensis* BCT-7112 on the vaccine response, confirming what our group had already reported for other species [7,9,14]. The presence of *B. toyonensis* could be detected in feces from the 3rd day of supplementation, reaching a plateau on the sixth day and remaining until 42 days. This finding suggests that the different vaccine response in the supplemented comparing with non-supplemented group was mediated by the *B. toyonensis*.

We observed that the ELISA values of anti-rTENT antibodies in supplemented animals were significantly higher ($p < 0,05$) from day 21 post-vaccination and remained higher until day 84 of the experiment compared to non-supplemented animals. ELISA values specific antibodies against rTENT were 3 times higher in the supplemented group on day 35 (14 days after the second dose) compared to the non-supplemented group. It is worth noting that the highest ELISA values of specific total IgG against rTENT in the group not supplemented with the two vaccine doses were similar to the levels observed in the group supplemented with only one vaccine dose (Figure 2). This same trend was observed when we titrated total IgG specific against rTENT. These data corroborate those of Santos et al. (2021)[7], who reported a significant difference in the first vaccine dose administered to animals supplemented with *B. toyonensis* BCT-7112 compared to controls, suggesting an immunomodulatory effect already in the first vaccine sensitization.

IgG sub-isotypes can be indirect indicators of T lymphocyte responses and may indicate an immune response directed towards the helper T lymphocyte type (e.g., Th1, Th2, Treg, etc.) [20]. The IgGa (IgG1) and IgGb (IgG4/7) sub-isotypes are attributed with the ability to fix complement and mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity, IgGT (IgG3/5) does not have such characteristics, however, it is efficient in neutralizing toxins such as those from *Clostridium* sp. [21]. Even knowing that ELISA values are not quantitative and not knowing real affinity/avidity of sub-isotypes, one might suggest that all samples are subjected to these variables, so a comparison was made. Assuming that, our findings suggests that ELISA values for IgGa sub-isotype was higher than the other two sub-isotypes in both groups. In previous studies [22,23] with vaccines with different antigens (bacterins and recombinant) the sub-isotype with high ELISA values was IgGT, differing from the present study where IgGa was highest. So, one may speculate that the high ELISA values observed for IgGa could be an effect mediated by *B. toyonensis*

supplementation. According to Bannai et al., (2018)[24] the IgG1 subclass is related to neutralization capacity against Equine herpesvirus type 1 (EHV-1), suggesting that similar neutralizing capacity could occur for tetanus toxin.

Observing the dynamics of IgGT, and following the same IgGa presumption, one can suggest that *B. toyonensis* also plays a role in modulating this sub-isotype. Our finding shows from the 35th an increase in ELISA values for IgGT in the supplemented group compared to the control group. In a study evaluating the immune response to tetanus toxoid in horses, was reported that after vaccine boost there was a predominance of the IgG T sub-isotype similar to that observed in the present study [25]. IgGT is the subclass with the greatest capacity to trigger a respiratory burst via binding to Fc receptors and has a greater capacity for neutralizing toxins, which is desirable in immunization against tetanus [21]. However, no difference in ELISA values was observed for IgGb between the supplemented and control groups.

The mechanisms of action involving the modulation of the immune response by probiotics are not fully understood. However, it is known that the interaction of probiotics with intestinal epithelial cells, dendritic cells, and lymphocytes [26] induces a modulation of the innate and adaptive immune response, and by doing, increase the production of cytokines, polarizing the responses of T lymphocytes helpers in Th1, Th2 and/or Treg [27]. The relative transcription of cytokines observed in PBMCs from horses supplemented with *B. toyonensis* BCT-7112 may be a key factor in better understanding the modulation of the vaccine response. PBMCs from animals supplemented and stimulated with *B. toyonensis* had a higher fold mRNA transcription of *IL1*, *TNF- α* , *IL4* and *IL10*. Also, when PBMCs were stimulated with ConA, only the PBMCs from supplemented horse showed increased cytokines transcription. Interesting, when the vaccine antigen rTENT was used to stimulate the PBMCs, a significant ($p < 0.05$) lower fold mRNA transcription levels was observed for both groups, supplemented and non-supplemented. However, the rTENT stimuli in PBMCs from supplemented horses were significant ($p < 0.05$) higher than the no-supplemented control group, however no *IL10* transcription was detected. Note worth, was *IL10* transcription was only detected with the *B. toyonensis* supplementation and/or stimuli. Our group and others have reported *IL10* transcription in experiment were the *B. toyonensis* supplementation able to modulate the expression of IL-10 [4,28–30]. Thus, one may suggest that *B. toyonensis* supplementation might play a role in the *IL10* transcription.

IL-1 and TNF- α are pro-inflammatory cytokines that in the supplemented group had an increase in mRNA transcription of 14.4 and 8.5 times respectively when compared to the control group. There is evidence that IL1-mediated signaling in dendritic cells contributes to their maturation, migration and accumulation in lymphoid organs, and plays a role in secondary activation during communication between dendritic cells and T lymphocytes [31], which plays an important role in the immunogenicity of vaccine antigens [32]. Tumor Necrosis Factor α is the cytokine with the greatest pro-inflammatory action and plays important role in host defense, activating innate and adaptive immunity, inducing the maturation of dendritic cells and activation of T lymphocytes [31,33,34]. It is also recognized that TNF- α had a vaccine adjuvant activity [24].

IL-4 is a hallmark cytokine of Th2 immune response, which is fundamental for the humoral immune response, as it favors the production of antibodies [35]. IL-4 plays an essential role in stimulating B lymphocytes to switch IgG classes and is also responsible for activating innate immune cells, such as basophils and mast cells [35]. IL-10 was initially described as a T helper 2 (TH2)-type cytokine [36], but further evidence suggested that the production of IL-10 was associated with regulatory T (Treg) cell responses [28,29]. IL-10 production seems to be associated with many immune cells, affirming its crucial role as a feedback regulator of diverse immune responses. However, has been described that this cytokine can also act by stimulating the proliferation of B lymphocytes by stimulating the production of antibodies [37]. The supplemented group showed an increase in *IL4* and *IL10* mRNA transcription of ~6.3-fold and ~7.0-fold, respectively, when stimulated with *B. toyonensis* BCT-7112. These findings suggest that one probable mechanism involved in the vaccine response in *B. toyonensis* supplemented animals was mediated by the cytokines.

5. Conclusion

The data presented in this study demonstrated that supplementation with *B. toyonensis* BCT-7112 modulates and improves the immune response to the experimental recombinant vaccine against *Clostridium tetani* in horses. Our results suggest that *B. toyonensis* BCT-7112 has an adjuvant effect, amplifying the immune response, opening the prospect of its use as a strategy to improve the vaccine immune response in horses. However, more studies are needed to better understand the mechanisms involved in immunomodulation mediated by *B. toyonensis* BCT-7112 in horses.

Declaration of Competing Interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) is acknowledged by the fellows MCA, NLC and VSG.

References

- [1] Pollard AJ, Bijker EM. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat Rev Immunol* 2021;21. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7>.
- [2] Moreira C, Ferreira MRA, da Cunha CEP, Donassolo RA, Finger PF, Moreira GMSG, et al. Immunogenicity of a bivalent non-purified recombinant vaccine against botulism in cattle. *Toxins (Basel)* 2018;10. <https://doi.org/10.3390/toxins10100381>.
- [3] Huang Y, Adams MC. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *Int J Food Microbiol* 2004;91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.07.001>.
- [4] Roos TB, de Lara AP de SS, Dummer LA, Fischer G, Leite FPL. The immune modulation of *Bacillus cereus* var. *Toyo* in mice immunized with experimental inactivated Bovine Herpesvirus Type 5 vaccine. *Vaccine* 2012;30. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.007>.
- [5] Sánchez MT, Ruiz MA, Morales ME. Microorganismos probióticos y salud. *Ars Pharm* 2015;56. <https://doi.org/10.4321/s2340-98942015000100007>.
- [6] Gil-Turnes C, Rochedo Conceição F, Rodrigo Gil de los Santos J. *Bacillus cereus* var. *toyo* IMPROVES FEED EFFICIENCY AND HEALTH IN ANIMALS. *Int J Probiotics Prebiotics* 2007;2.
- [7] Santos FDS, Maubrigades LR, Gonçalves VS, Franz HC, Rodrigues PRC, Cunha RC, et al. *Bacillus Toyonensis* BCT-7112T Spores as Parenteral Adjuvant of BoHV-5 Vaccine in a Murine Model. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2021;13. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09753-z>.
- [8] Roos TB, de Moraes CM, Sturbelle RT, Dummer LA, Fischer G, Leite FPL. Probiotics *Bacillus toyonensis* and *Saccharomyces boulardii* improve the vaccine immune response to Bovine herpesvirus type 5 in sheep. *Res Vet Sci* 2018;117. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.12.022>.
- [9] Franz HC, Conrad NL, Santos FDS, Gonçalves VS, Fonseca RN, Brasil CL, et al.

- Immunomodulatory effect of *Bacillus toyonensis* BCT-7112 supplementation in puppies vaccinated against canine parvovirus. *Pesqui Vet Bras* 2020;40. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6730>.
- [10] Popoff MR. Tetanus in animals. *J Vet Diagnostic Investig* 2020;32. <https://doi.org/10.1177/1040638720906814>.
- [11] Kinoshita Y, Yamanaka T, Kodaira K, Niwa H, Uchida-Fujii E, Ueno T. Assessment of tetanus revaccination regimens in horses not vaccinated in the previous year. *J Vet Med Sci* 2023;85. <https://doi.org/10.1292/jvms.23-0158>.
- [12] Paillot R, Pitel CM, D'Ablon X, Pronost S. Equine vaccines: How, when and why? Report of the vaccinology session, French equine veterinarians association, 2016, reims. *Vaccines* 2017;5. <https://doi.org/10.3390/vaccines5040046>.
- [13] Ferreira MRA, Moreira MSG, Da Cunha CEP, Mendonça M, Salvarani FM, Moreira ÂN, et al. Recombinant Alpha, Beta, and Epsilon toxins of *Clostridium perfringens*: Production strategies and applications as veterinary vaccines. *Toxins (Basel)* 2016;8. <https://doi.org/10.3390/toxins8110340>.
- [14] Santos FDS, Menegon YA, Piraine REA, Rodrigues PRC, Cunha RC, Leite LPL. *Bacillus toyonensis* improves immune response in the mice vaccinated with recombinant antigen of bovine herpesvirus type 5. *Benef Microbes* 2018;9:133–42. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0021>.
- [15] Moreira C, da Cunha CEP, Moreira MSG, Mendonça M, Salvarani FM, Moreira ÂN, et al. Protective potential of recombinant non-purified botulinum neurotoxin serotypes C and D. *Anaerobe* 2016;40. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.05.012>.
- [16] Nicholson WL, Setlow P. Sporulation, germination and out- growth. *Mol. Biol. methods Bacillus*, 1990.
- [17] Leite F, Kuckleburg C, Atapattu D, Schultz R, Czuprynski CJ. BHV-1 infection and inflammatory cytokines amplify the interaction of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin with bovine peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Vet Immunol Immunopathol* 2004;99. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.02.004>.
- [18] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001;25:402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- [19] Mair-Jenkins J, Saavedra-Campos M, Baillie JK, Cleary P, Khaw FM, Lim WS, et al. The effectiveness of convalescent plasma and hyperimmune

- immunoglobulin for the treatment of severe acute respiratory infections of viral etiology: A systematic review and exploratory meta-analysis. *J Infect Dis* 2015;211. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu396>.
- [20] Estes DM, Brown WC. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;90. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00201-5](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00201-5).
- [21] Lewis MJ, Wagner B, Woof JM. The different effector function capabilities of the seven equine IgG subclasses have implications for vaccine strategies. *Mol Immunol* 2008;45. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.06.158>.
- [22] Santos AC, Nogueira CEW, dos Santos Suñe Moraes B, Müller V, Mousquer MA, Leite FPL. Immune response of adult horses, pregnant mares and foals to an experimental vaccine with recombinant EMA-2 protein of *Theileria equi*. *Res Vet Sci* 2021;139:186–92. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.07.013>.
- [23] Santos AC, Leite FPL, Vianna AM, Weege GB, Finger IS, Müller V, et al. Dynamics of humoral immune response in pregnant mares and foals vaccinated with *Theileria equi* recombinant EMA-2. *Pesqui Vet Bras* 2018;38. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5321>.
- [24] Bannai H, Nemoto M, Tsujimura K, Yamanaka T, Kokado H, Kondo T, et al. Comparison of protective efficacies between intranasal and intramuscular vaccination of horses with a modified live equine herpesvirus type-1 vaccine. *Vet Microbiol* 2018;222. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.06.015>.
- [25] Schnabel CL, Fletemeyer B, Lübke S, Marti E, Wagner B, Alber G. CD154 Expression Indicates T Cell Activation Following Tetanus Toxoid Vaccination of Horses. *Front Immunol* 2022;13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.805026>.
- [26] Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab* 2012;61. <https://doi.org/10.1159/000342079>.
- [27] Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: Comparison with commensals and pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2010;8. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2297>.
- [28] Moore KW, De Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.683>.
- [29] Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings

- 477 MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans.
 478 Immunol Rev 2006;212. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00420.x>.
- 479 [30] Maubrigades LR, Santos FDS, Gonçalves VS, Rodrigues PRC, Leite FPL.
 480 Association of *Bacillus toyonensis* spores with alum improves bovine herpesvirus
 481 5 subunit vaccine immune response in mice. Vaccine 2020;38.
 482 <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.10.066>.
- 483 [31] Wan YY, Flavell RA. How diverse-CD4 effector T cells and their functions. J
 484 Mol Cell Biol 2009;1. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjp001>.
- 485 [32] Van Den Eeckhout B, Tavernier J, Gerlo S. Interleukin-1 as Innate Mediator of T
 486 Cell Immunity. Front Immunol 2020;11.
 487 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.621931>.
- 488 [33] Brunner C, Seiderer J, Schlamp A, Bidlingmaier M, Eigler A, Haimerl W, et al.
 489 Enhanced Dendritic Cell Maturation by TNF- α or Cytidine-Phosphate-Guanosine
 490 DNA Drives T Cell Activation In Vitro and Therapeutic Anti-Tumor Immune
 491 Responses In Vivo. J Immunol 2000;165.
 492 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.11.6278>.
- 493 [34] Kayamuro H, Abe Y, Yoshioka Y, Katayama K, Nomura T, Yoshida T, et al. The
 494 use of a mutant TNF- α as a vaccine adjuvant for the induction of mucosal
 495 immune responses. Biomaterials 2009;30.
 496 <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.009>.
- 497 [35] Paul WE, Zhu J, Yamane H. Determination of Effector CD4 T Cell Populations.
 498 Annu Rev Immunol 2010;28:445–89. <https://doi.org/10.1038/nri2735>.How.
- 499 [36] Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Th2 Clones Secrete a Factor that
 500 Inhibits Cytokine Production by Th1 Clones. J Exp Med 1990;170.
- 501 [37] Zhu J, Paul WE. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. Cell Res 2010;20.
 502 <https://doi.org/10.1038/cr.2009.138>.

4.2 Artigo 2

Resposta imune humoral em potros vacinados com vacina recombinante experimental de tétano.

Mayara C. Abreu; Neida L. Conrad; Fábio P. L. Leite

HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN FOALS VACCINATED WITH EXPERIMENTAL RECOMBINANT TETANUS VACCINE.

MAYARA CAETANO ABREU¹; NEIDA CONRAD²; FÁBIO PEREIRA LEIVAS
LEITE³

¹Universidade Federal de Pelotas – mayaraabreu@live.com

²Universidade Federal de Pelotas – conradneida@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com

ABSTRACT

The immunological response in foals begins during intrauterine life and continues to develop until the first year of life. Pathogens can affect foals early on after birth, warranting vaccine schemes within this immunological window, providing greater protection in this period. We vaccinated two-month-old foals and evaluated their immunological response. We used 20 horses in two groups: (1) adult horses, two vaccine doses; (2) pregnant mares, 3 vaccine doses in foals aged 60 days. Serum obtained weekly was evaluated by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of the humoral response. Results: A humoral response was detected in foals after two vaccine doses, and the response increased with the third dose. The IgGa, IgGb, and IgGT isotypes were detected in foals. Adult horses and 60-day-old foals exhibited the same trend in total IgGs and isotypes. Conclusion: Two-month-old foals mounted a humoral response to the experimental recombinant tetanus vaccine similar to that in adults.

KEYWORDS: vaccination; horses; neonates

Introduction

Current guidelines recommend tetanus immunization for horses using three tetanus toxoid vaccinations starting at three months of age. However, vaccination of dams usually starts at 6 months, as colostral immunity can compromise the foal's response (AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 2023). Researchers have reported fully mature immune responses in neonatal foals (TALLMADGE, 2017). Tetanus mortality rate among foals is similar to that in adults (68.4 and 66.7%, respectively), highlighting the importance of immunizing foals. Moreover, the average hospitalization time for affected horses is 10 days and costs ~€902 in adults and €835 in foals (VAN GALEN et al., 2017). Recombinant vaccines have stood out on the market for being safe, both in their manufacture and in their use, in addition to a shorter production time (MOREIRA et al., 2018).

Tetanus is a neurological disease caused by *Clostridium tetani*, which has worldwide distribution. The disease is characterized by hypertonia of striated muscles with overlapping clinical paroxysmal muscle spasms caused by neurotoxic toxins, including tetanospasmin. (POPOFF, 2020). The disease can affect all mammals, but horses are the most sensitive as the agent colonizes their enteric tract (HÉLÈNE, AMORY, 2011).

This study aimed to evaluate the humoral response of two-month-old foals inoculated with an experimental recombinant tetanus vaccine compared with adult horses.

Materials and Methods

Experimental Design

Were used 10 pregnant mares and foals and 10 healthy adult horses from the Palma Agricultural Center of the Federal University of Pelotas/RS. The pregnant mares were monitored during pregnancy to ensure that there were no complications up to the time of delivery, and blood samples were collected to obtain serum at 7 months of gestation. The foals born to these mares were vaccinated 2 months after birth (day 0), with a booster at 21 and 35 days after the first dose. We administered 1 mL of the recombinant tetanus protein (rTENT, 200 µg) adsorbed in aluminum hydroxide (10%) intramuscularly. Adult horses received two doses of same vaccine on days 0 and 21. Blood samples (5 mL) were obtained in sterile tubes (Vacunteiner®) by venipuncture of the jugular vein of parent mares, foals, and adult horses on days 0, 21, 35, 42 and 49 of the experiment.

Humoral Response

Total IgG levels were evaluated using indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Briefly, 96-well polystyrene plates were sensitized with 200 ng/well of rTENT diluted in carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) and incubated overnight at 37 °C. The serum samples were diluted 1:100 in a skim milk powder solution in phosphate saline solution (PBS, pH 7.6). Subsequently, the peroxidase-conjugated anti-horse (Sigma-Aldrich) antibody was added and diluted 1:4000 in PBS. Between each step, the plates were incubated for 1 h at 37 °C and washed with PBS-Tween™20 (0.05%). To visualize the reactions, a chromogenic substrate was added (0.004 mg of o-phenylenediamine [OPD],

15 μL of H_2O_2 , and 10 mL of phosphate buffer citrate pH 4.0). After 15 min incubation at room temperature ($\sim 25^\circ\text{C}$) in the dark, a 3% sulfuric acid solution was used to stop the chromogen reaction. Afterwards, the absorbances were measured on EZ Read 400 microplate reader (Biochrom®) reader at 492 nm. Isotyping was performed as previously described (VIANNA et al., 2014). Briefly, anti-isotypes (BIO-RAD) for IgG1 and IgG4-7 were diluted in PBS 1:2000, while IgG3-5 was diluted 1:5000. Statistical evaluation was performed using GraphPad Prism v7. The t-test and one-way analysis of variance (ANOVA) were used, followed by Tukey for multiple comparison tests.

Results and Discussion

Humoral Response

Anti-rTENT specific IgG was detected in the foals after the primary vaccination. Antibody levels increased after the second and third vaccine doses (Figure 1). Levels of anti-rTENT antibodies in dams were below the cut-off (~ 0.149), suggesting that the foals produced anti-rTENT IgG in response to the vaccine and did receive them in colostrum (Figure 1). This is consistent with our previous study evaluating a theileriosis recombinant vaccine in two-month-old foals (SANTOS et al., 2021).

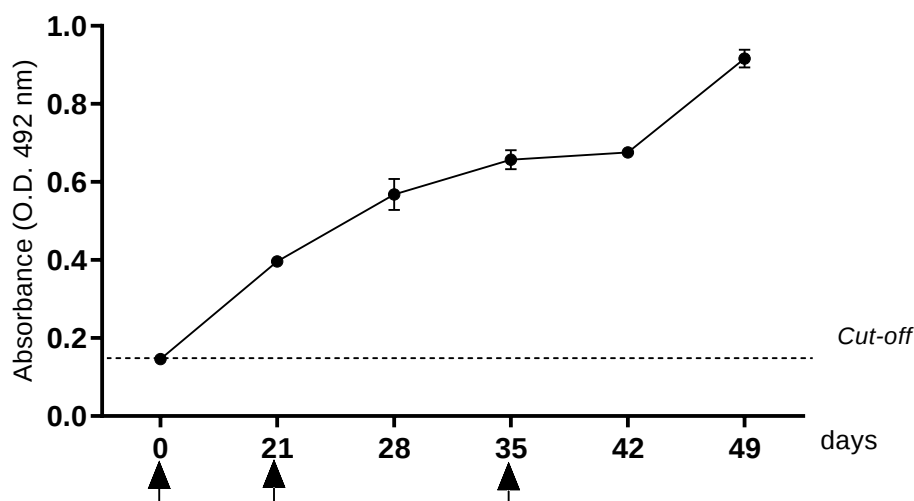


FIGURE 1. rTENT-specific antibody levels. The data represents the mean $\pm$ standard deviation (SD). Values were obtained from individual sera and anti-rTENT specific IgG absorbance. The arrows represent the vaccination days.

The foals mounted a humoral response to the vaccine doses. The IgGb isotype reached the highest levels, followed by IgGa (Figure 2), and IgGT with the lowest response. IgG isotypes can indicate the pattern of T lymphocyte responses and whether an immune response is directed towards type 1 or 2 T helper cells (ESTES et al., 2002). However, immunological response patterns in foals may vary depending on the antigen used (TALLMADGE, 2017). For instance, in our previous study with a recombinant theileriosis vaccine, the foals produced only IgGa for 3 months (SANTOS, et al, 2021). Furthermore, an inactivated bovine respiratory virus vaccine elicited only IgGa and IgGT isotypes, with three-month-old foals exhibiting higher antibody levels than three-day-old foals (RYAN & GIGUERE, 2010).

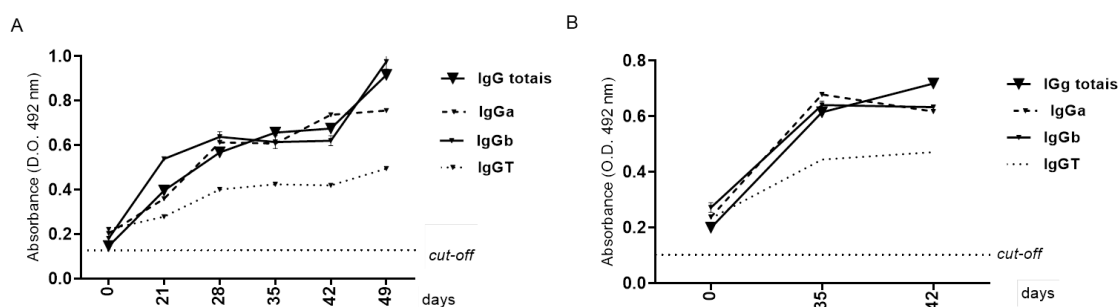


FIGURE 2. IgGa, IgGb, and IgGT isotypes and anti-rTeNT specific total IgGs. The data represents the mean $\pm$ standard deviation (SD) of the absorbance values for specific anti-rTeNT IgG isotypes in pooled sera. Data is shown separately for foals (A) and adult horses (B).

An effective horse vaccine must induce IgG1, IgG3, IgG4, and IgG7 subtypes (Migdall et al., 2022). Adult horses and foals mounted a similar and specific humoral response to the experimental vaccine (Figure 2), including IgGa, IgGT, and IgGb. Moreover, the IgGa(1) and IgGb(4/7) isotypes were predominant in foals and adult horses. This pattern is likely characteristic of the recombinant antigen used.

IgGa(1) and IgGb(4/7) complement fixation and mediation of antibody-dependent cellular cytotoxicity, whereas IgGT efficiently neutralizes toxins (Lewis et al., 2008). IgGT levels in this study were lower than those of the other isotypes. However, an increase in IgGT levels was observed after immunization, highlighting the efficacy of this vaccine in eliciting a complete humoral response including toxin-neutralizing antibodies.

Conclusion

The recombinant tetanus vaccine induced a humoral response in vaccinated foals at 2 months of age. The vaccine response in foals was similar to that in adult horses.

References

POPOFF, M. R. Tétano em animais. J Vet Diag 2020; 32: 184 – 191

DI FILIPPO, P.A., GRAÇA, F.A.S., COSTA, A.P.D., COUTINHO, I.S. & VIANA, I.S. [Clinical and epidemiological findings and response to treatment of 25 cases of tetanus in horses occurred in Norte Fluminense, Rio de Janeiro, Brazil.] Achados clínico-epidemiológicos e resposta ao tratamento de 25 casos de tétano em equinos ocorridos na região Norte Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil. Revista Brasileira de Medicina Veterinária, 38(1):33-38, 2016

GALEN, GABY VAN; SAEGERMAN, CLAUDE; RIJCKAERT, JOKE; AMORY, HELENE; ARMENGOU, LARA; BEZDEKOVA, BARBORA; DURIE, INGE; FINDSHOJ, RIKKE; DELANY, NATHALIE FOUCHE; HALEY, LAURA; HEWETSON, MICHAEL; VAN DEN HOVEN, RENE; KENDALL, ANNA; MALALANA, FERNANDO; CAVALLERI, JESSIKA MULLER; PICAVET, TRESEMIEK; ROSCHER, KATJA; VERWILGHEN, DENIS; ESER, MERET WEHRLI; WESTERMANN, CORNELIE; MAIR, TIM. Retrospective evaluation of 155 adult equids and 21 foals with tetanus in Western, Northern, and Central Europe (2000–2014). Part 1: Description of history and clinical evolution. Journal of Veterinary Emergency and Critical Care () 2017, pp 1–12 doi: 10.1111/vec.12668

ESTES, D. M.; BROWN, W., L. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. Veterinary Immunology and Immunopathology. v. 90, n.10, 2002.

LEWIS, MELANIE J.; WAGNER, BETTINA B; WOOF, JENNY M. The different effector function capabilities of the seven equine IgG subclasses have implications for vaccine strategies Molecular Immunology 45, 818–827, 2008.

SANTOS, A. C.; NOGUEIRA, C. E. W.; MORAES, B. S. S.; MÜLLER, V.; MOUSQUER, M. A.; LEITE, F. P. L. L. Immune response of adults horses, pregnant mares and foals to an experimental vaccine with recombinant EMA-2 protein of Theileria equi. Recherche in Veterinary Science. v. 139, n. 186, 2021.

TALLMADGE, REBECCA; MILLER, STEVEN C.; PARRY, STEPHEN A.; FELIPPE, MARIA JULIA B. Antigen-specific immunoglobulin variable region sequencing measures humoral immune response to vaccination in the equine neonate. Plos One. Pag 1-24.Maio, 2017

RYAN, C., GIGUERE, S. Os neonatos equinos atenuaram as respostas imunes humorais e mediadas por células a uma vacina com adjuvante morta em comparação com cavalos adultos. Clin Vaccine Immunol CVI. 17(12):1896–902. Dezembro de 2010;

(Migdall et al., 2022 [DOI:10.1038/s41598-022-17532-1](https://doi.org/10.1038/s41598-022-17532-1))

4.3 Artigo 3

***Bacillus toyonensis* supplementation amplify the vaccinal response to *Clostridium haemolyticum* recombinant experimental vaccine in equine**

Mayara C. Abreu; Neida L. Conrad; Vitória S. Gonçalves; Francisco D. S. Santos; Clovis M. Júnior; Jeferson Ramos; Fabricio R. Conceição; Fábio P. L. Leite

Artigo a ser submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira

***Bacillus toyonensis* amplia a duração da resposta da vacina recombinante experimental contra hemoglobinúria bacilar em equinos**

***Bacillus toyonensis* supplementation amplify the vaccinal response to *Clostridium haemolyticum* recombinant experimental vaccine in equine**

Mayara C. Abreu¹; Neida L. Conrad²; Vitória S. Gonçalves; Francisco D. S. Santos ; Clovis M. Júnior; Fabricio R. Conceição; Fábio P. L. LEITE⁴

0009-0001-4883-4595

Registro ORCID (acrescentar abaixo os ORCIDs de todos os autores, se possível):

ABSTRACT. Abreu, M.C.; Conrad, N.L.; Gonçalves, V.S.; Leite, F.P.L.- ***Bacillus toyonensis* amplia a duração da resposta da vacina recombinante experimental contra hemoglobinúria bacilar em equinos**. Pesquisa Veterinária Brasileira xxxx 2024. Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Rua Ernani da Rosa 354 s/n, Cx. Postal 354, Capão do Leão, RS 96160000, Brazil E-mail: fleivasleite@gmail.com

RESUMO: As vacinas recombinantes têm sido uma alternativa mais segura na prevenção de doenças infecciosas, mas em geral por serem menos imunogênicas, busca-se elementos que ampliem o estímulo de resposta imune vacinal. Os microrganismos probióticos podem estimular a resposta imune inata e adaptativa. *Bacillus toyonensis* é uma bactéria Gram positiva, não patogênica e tem sido utilizada nas últimas décadas como probiótico na suplementação animal. A suplementação com *B. toyonensis* induz efeitos imunomoduladores, aumentando a resposta vacinal em diversas espécies. *Clostridium* sp. possui distribuição mundial e atinge todos mamíferos, sendo que *C. haemolyticum* produz a β toxina que é epiteliotóxica e hepatotóxica. A prevenção é realizada através da vacinação anual. Este estudo objetivou avaliar o efeito da suplementação com *B. toyonensis* na modulação da resposta imune vacinal em equinos vacinados com uma vacina recombinante contra a hemoglobiúria bacilar (rTCHB). Foram utilizados 20 equinos, divididos em 2 grupos: grupo 1, os animais foram suplementados via oral, por um período de 42 dias, com esporos viáveis de *B. toyonensis* (1×10^8), 7 dias anterior da primo vacinação; o grupo 2, controle, recebeu PBS nos mesmos dias da suplementação com *B. toyonensis*. Foram coletadas amostras de sangue e o soro separado para avaliação da resposta imune humoral através de ELISA indireto e celular através da análise da transcrição de citocinas (qPCR) em células do sangue periférico. Resultados: Os animais suplementados com *B. toyonensis* obtiveram níveis de anticorpos específicos anti-rTCHB ~2 vezes

mais elevados do que ($p<0.05$) os controle em todos os pontos estudados. Os animais suplementados já aos 14 dias pós primo vacinação apresentavam anticorpos específicos anti-rTCHB, enquanto os controles não. Ao avaliar os subtipos observamos um mesmo padrão entre suplementados e controles. Entretanto a suplementação modulou IgGa e IgGb a níveis significativos ($p<0,05$) mais elevados (~ 1.5 vezes) dos que os controles, não tendo influência na IgGT. Na expressão relativa de citocinas o grupo suplementado e estimulado com o *B. toyonensis* apresentou uma transcrição relativa das citocinas ($p<0.05$) superior em ~ 15 para *IL1*, $\sim 8,5$ para *TNF- α* ~ 7 para *IL10* e $\sim 6,5$ para *IL4*, e quando estimuladas com o rTCHB a expressão relativa das citocinas *IL1* e *TNF α* foram similares em ambos os grupos, entretanto a *IL10* foi ~ 13 vezes superior no grupo suplementado e a *IL4* apresentou uma transcrição reduzida. Conclusão: A suplementação de equinos com *B. toyonensis* amplificou a resposta imune, humoral e modulou a resposta celular, para a vacina recombinante experimental contra a hemoglobinúria bacilar, sugerindo ser uma promissora alternativa para aumentar a eficácia vacinal.

TERMOS INDEXADOS: imunomodulação; imunoglobulinas; cavalos, citocinas;

INTRODUCTION

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, o número de cabeças do rebanho equino em 2022 é de 5.834.544 cabeças. A equideocultura movimenta anualmente R\$30 bilhões no Brasil, destacando a importância econômica desta espécie (IBEqui, 2023). Os imunobiológicos e antiparasitários representam a classe terapêutica mais comercializada no mercado veterinário, destacando a importância das vacinas, abrangendo 25% cada uma do mercado veterinário brasileiro (SINDAN, 2022).

As clostridioses tem alta letalidade em equinos, apesar da prevalência variar de acordo com o agente (Davies et al. 2017). *Clostridium haemolyticum* é um bastonete anaeróbico, que produz a β -toxina, uma fosfolipase C, que é endoteliotóxica e hepatotóxica, promove a trombose, necrose hepática, aumento dos líquidos intracavitários e lise dos eritrócitos podendo manifestar hemoglobinemia e hemoglobinúria (Navarro & Uzal, 2020). Poucos relatos em equinos isolando o *C. haemolyticum*, foram reportados. Dentre eles, esse agente foi isolado em quadros de peritonite séptica e hepatite necrótica (Hepworth et al., 2016) (Nyaoke et al., 2017). Em casos de hepatite, a presença de parasitos da família *Strongylidae* pode gerar um ambiente hipóxico favorável à proliferação de Clostrídeos, onde nesse casos foi isolado o *C. haemolyticum* de equinos (Nyaoke et al., 2017) (Davies et al., 2017). Cabe salientar a dificuldade no isolamento dos Clostrídeos, tanto por serem microrganismos anaeróbios exigentes, quanto pela necessidade de preservação dos tecidos à serem analisados, sendo a identificação molecular por PCR uma alternativa valiosa como diagnóstico diferencial em doenças com apresentações clínicas neurológicas, toxêmicas, insuficiências hepáticas agudas e peritonites em equinos (Nyaoke et al., 2017).

O controle bem-sucedido das clostridioses foi alcançado pelo uso das vacinas, tais vacinas comercialmente encontradas são produzidas por toxinas inativadas (toxóides) ou material celular inativado (bacterinas) (Titball et al., 2003). As vacinas recombinantes vêm se destacando

como uma alternativa promissora por terem o antígeno vacinal produzido de forma segura, tanto durante a produção quanto na inoculação na espécie alvo (MOREIRA et al., 2018). Objetivando ampliar a resposta vacinal se faz uso de adjuvantes ou imuno potenciadores. Probióticos tem sido utilizado como imuno potenciadores vacinais em vacinas convencionais ou recombinantes em diferentes espécies (SANTOS et al., 2021; ROOS et al., 2018; FRANZ et al., 2021). Probióticos são microrganismos vivos que administrados em doses adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Diversos microrganismos apresentam efeito probiótico (SANCHEZ et al., 2015). Entre os probióticos, o *Bacillus toyonensis* tem demonstrado efeitos imunomoduladores aumentando a eficácia vacinal. Estudos de nosso grupo tem demonstrado que a suplementação com *Bacillus toyonensis*, é uma alternativa viável e promissora para melhorar a resposta vacinal, principalmente as vacinas compostas de antígenos recombinantes (Santos et al, 2011,2012, 2013, 2024; ROOS et al., 2012). *B. toyonensis* é uma bactéria Gram positiva, não patogênica e tem sido utilizada nas últimas décadas como probiótico na suplementação animal (GIL-TURNES e CONCEIÇÃO, 2007). A administração de *B. toyonensis* induz efeitos imunomoduladores com a capacidade de aumentar a eficácia das vacinas em diversas espécies (SANTOS et al., 2021; ROOS et al., 2018; FRANZ et al., 2021).

Sabendo que as vacinas recombinantes representam uma alternativa mais segura, porém algumas são pouco imunogênicas, os probióticos podem ser uma alternativa valiosa para aumentar a resposta imune dessas vacinas. Este estudo objetivou avaliar a modulação do probiótico *B. toyonensis* na resposta imune de equinos vacinados com vacina recombinante experimental contra a toxina de *Clostridium haemolyticum*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Probiotic culture. *Bacillus toyonensis* strain (BCT-7112) was recovered from the microorganism collection of the Microbiology laboratory, at the UFPel Biotechnology Center. *B. toyonensis* preparations were made as previously described by Santos et al. (2018) [14]. Briefly, the bacteria were inoculated on Brain Heart Infusion (BHI) agar (Neogen, Lansing, MI, USA) and the plates were incubated at 37 °C for 24 h. About 3–5 individual colonies were picked, inoculated into BHI broth (Neogen), and placed on an orbital shaker at 37 °C maintained at 200 rpm for 16 to 18 h. The culture served as an inoculum for propagation in a bioreactor (Biostat® B, Braun Biotech International, Melsungen, Germany) containing 8 L of Nutrient Yeast Extract Salt medium (NYSM). The fermentation conditions were controlled, and air supply was maintained between 0.5 and 1.5 (v/v), so that approximately 80% of the dissolved oxygen in the medium was utilized during fermentation. The agitation speed was maintained at 300 rpm and temperature at 37 °C for 96 h. When 90% of the bacterial cells had sporulated, as confirmed by Wirtz-Conklin stain, the culture was centrifuged in a refrigerated Sorvall centrifuge® RC-6 Plus (Langenselbold, Germany) at 5.000 × *g* for 20 min at 4 °C. The supernatant was removed, and the spore pellet was suspended in 1 L of phosphate-buffered saline. Spore counts were determined by serial dilution and plate count method

The daily amount of probiotic supplied to the horses was 4×10^9 CFU of *B. toyonensis* diluted in molasses (ALIMEL- Supra®- Lot 158613, pH ~6.0) in a 3:1 ratio. The probiotic-molasses solution (40 ml) was added to 500 g of commercial feed and offered individually to the animals, with the aim of increasing palatability.

Vaccine production. The recombinant Bacillary Hemoglobinuria vaccine, composed by 400 µg of recombinant Tetanus toxin N-terminal (rTCHB) adsorbed in 10% Aluminum Hydroxide (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), was provided by the Applied Immunology laboratory CDTec/UFPel, produced according to the protocol described by Moreira JR et al. (2016) [15] with some modifications. Briefly, *Escherichia coli* BL21 (DE3) strain Star were transformed with the recombinant vector pAE/TCHB. Transformed bacteria were grown in Luria-Bertani (LB) broth (37 °C, 150 RPM) supplemented with ampicillin (100 mg/mL). When the culture reached OD₆₀₀ 0.6-0.8, the expression was induced with IPTG (0.5 mM) for 3 h at 37 °C, 150 RPM. Cells were harvested by centrifugation (10,000 g, 15 min, 4 °C), suspended in lysis buffer (0.2 M NaH₂PO₄, 0.5 M NaCl, 10 mM imidazol), incubated with 50 mg/mL lysozyme (1 h, 4 °C) and disrupted by sonication (60 kHz). Lysed cells were centrifuged as described and the supernatant was collected, while pellets containing inclusion bodies were solubilized with lysis buffer containing 8 M urea for 16 h at 4 °C under agitation. Protein fractions were analyzed by SDS-PAGE (12%) prior to purification by Ni²⁺-affinity chromatography using AKTApurifier (GE Healthcare) according to manufacturer's instructions. Purified proteins were dialyzed against PBS (pH 7.4) and quantified with BCA Protein Assay (Pierce).

Ethical Statement. All experiments were carried out in accordance with the recommendations of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA). The protocols were reviewed and approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation – CEEA/UFPel (CEEA 6729-2021).

Experimental design. Twenty healthy horses of no defined breed, gelding, and mares with no history of tetanus vaccination were used. The horses were divided into 2 groups, containing 10 animals each: Group 1. Supplemented daily with *B. toyonensis*; Group 2. Not Supplemented. Supplementation was carried out for 42 continuous days, starting 7 days before the primary vaccination, and maintained until day 35 of the experiment. All animals were vaccinated, intramuscularly with two doses (2ml) of a recombinant bacillary hemoglobinuria toxin vaccine on days 0 and 21 of the experiment. Blood samples were collected by jugular venipuncture on days 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 64 and 84. The experimental design can be viewed in the graphical abstract. The animals were monitored daily for body temperature, respiratory rate through auscultation, and hematological parameters weekly (blood count and dosage of the enzymes Gamma Glutamyl Transferase, Aspartate Dehydrogenase, Alkaline Phosphatase and Creatinine).

Presence of *B. toyonensis* in animal feces. To analyze the transit time and quantify the concentration of *B. toyonensis* eliminated by the supplemented group of horses, fecal samples were collected directly from the rectal ampoule, daily, during the 42 days of supplementation, as well as in the period of 20 days after the end of supplementation. After collection, the samples were stored at 4 °C until analysis. The samples were subjected to heat treatment (86 °C for 15 min) to inhibit the growth of

vegetative cells and contaminants [16]. After heat treatment, logarithmic dilutions (base 2) were made and samples spreading into Brain Infusion Heart (BHI; Neogen, Lansing, MI, USA) agar plates. The plates were incubated at 37 °C for 24h, then colony counting (CFU) was evaluated. The identity of the microorganism was confirmed through biochemical tests.

Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). An in-house indirect enzyme linked immunoassay (ELISA) was used to evaluate the dynamics of specific anti-rTCHB- IgG. Briefly, plates were coated overnight at 4 °C with 0.2 µg of purified rTENT diluted in carbonate-bicarbonate buffer (0.05M pH 9.6). To evaluate the total IgG response throughout the experiment, sera were analyzed individually, diluted 1:100 in phosphate-buffered saline (PBS) and added in triplicate to previously sensitized plates. To establish the optimal concentration of antigen to coating plates as well as the optimal serum dilution to be tested, different concentrations of rTCHB and different control serum concentrations were screened in checkerboard titrations. To total IgG titration the pooled serum samples from day 35 were diluted in base 2, starting at 1:100 and increasing to 1:12800. The cut-off was determined as the mean absorbance of the groups at day 0 plus 2 standards deviations. For the IgG sub-isotypes, a Monoclonal Antibody Isotyping Reagents kit (Bio-Rad, Brazil, São Paulo, SP), was used following the same protocol above describe. A monoclonal mouse anti-horse IgGa (IgG1) (clone CVS48) and IgGb (IgG4-7) (clone CVS39) and a polyclonal goat anti-horse IgG(T) (IgG3-5) (AAI38) (Bio-Rad, Brazil, São Paulo, SP) were used. With serum diluted 1/100 in PBS-T and a polyvalent peroxidase conjugated anti-horse IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, US) was diluted 1/6,000. Reactions were visualized with ortho-phenylenediamine (OPD, Sigma-Aldrich) stopped with 2 N H₂SO₄. The absorbance values were measured in an EZ Read 400 microplate reader (Biochrom®) with a 492 nm filter.

PBMCs isolation, RNA isolation, cDNA synthesis and qPCR. To evaluate cytokine transcription, 10 ml of blood was collected from each horse by jugular venipuncture, with a “vacuntainer BD®” needle in tubes with 0.38% Sodium Citrate. Equine blood was centrifuged (Sorvall centrifuge® RC-6 plus (Langensfeld, Germany) at 500 × g for 30 min to isolate and collect white blood cells (PBMCs) as previously described by Leite et al. (2004) [17]. Then, two pools of cells from 5 horses each was used. Briefly, 5 × 10⁷ cells were cultured in 24-well plates (Kasvi, China) containing 1 ml of RPMI 1640 medium (Gibco, USA) with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco), 10,000 IU/ml of penicillin, 10 mg/ml streptomycin and 25 mg/ml amphotericin B (Gibco) for 24 h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. PBMCs were stimulated with 10µg/ml concanavalin A (ConcA, Sigma-Aldrich®), RPMI 1640, *Bacillus toyonensis* (10⁶ UFC), and rTCHB (10µg/well). ConcA and RPMI 1640 will serve as positive and negative controls, respectively. After the incubation period, the supernatant was discarded, and the cells were collected in TRIzol® (Sigma-Aldrich®). RNA was extracted by the TRIzol method according to the manufacturer's instructions. For cDNA synthesis and qPCR, 400 ng of RNA was used for cDNA synthesis, the reaction was carried out according to the instructions of the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). qPCR reactions were performed with 1 µl of cDNA, 5 µl of GoTaq® qPCR, 0.25 of each primer oligomer (Table 1) and 3.5 µl of RNase-free water, being carried out on the CFX96/BioRad® qPCR platform system. The mRNA transcription of the cytokines *IL1*, *IL4*, *IL10* and *TNF-α* was evaluated, where *B-gus* were used as reference genes. All

samples were analyzed in triplicate. From the Threshold Cycle (Ct) values obtained, the relative transcription of the genes was calculated by comparison with the transcription of *B-gus*, according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [18].

Table 1. Target genes and primers (5' to 3') used to determine gene transcription levels in PBMCs of vaccinated and control horses.

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>IL1</i>	TGTACCTGTGTTGTGGGATTGAAAG	GCTTTTCCATTTTCCTCTTTGGGTAA
<i>IL4</i>	TGGCCCGAAGAACACAGATG	CTTGAGGTTCTGTCCCAGTC
<i>IL10</i>	GTCATCGATTTCTGCCCTGT	GCTTCGTTCCCTAGGATGC
<i>TNF-α</i>	TTACCGAATGCCTTCCAGTC	GGGCTACAGGCTTGTCACCTT
<i>B-gus</i>	GACATCCGAGGGAAGGGCT	AGCCAACGAAGCAGGTTGA

Statistical evaluation, was performed with GraphPad Prism v7. Two-Way ANOVA was performed to analysis of variance followed by SIDAK for multiple comparison tests. Significance was set at $p < 0.05$.

RESULTADOS

Resposta humoral. Os animais do grupo suplementado com *B. toyonensis* e do grupo não suplementado apresentaram aumento nos níveis de anticorpos totais específicos anti-rTCHB (IgG) em resposta a vacinação a partir do dia 14. Os animais suplementados apresentaram níveis de IgG, aos 28 dias, ~2 vezes ($p < 0,05$) maiores do que o grupo não suplementado. Observando a dinâmica dos anticorpos, os dois grupos apresentaram um padrão similar de resposta até o dia 84 do experimento. Entretanto, níveis superiores para o grupo suplementado se mantiveram até o final do período experimental (Figura 1).

A partir dos 14 dias pós primo sensibilização (primeira dose vacinal) os níveis de IgG do grupo suplementado se mantiveram ~2 vezes maiores ($p < 0.05$) comparando aos do grupo controle. No dia 42 experimental observamos o pico dos níveis de anticorpos induzidos pela vacinação realizada nos dois grupos, sendo o suplementado com níveis superiores. Interessante, a partir do dia 42 houve uma queda gradativa nos níveis de anticorpos nos dois grupos, mantendo-se uma diferença nos níveis de anticorpos até o final das coletas deste estudo, sendo o grupo suplementado 2 vezes superior aos controle (Figura 1).

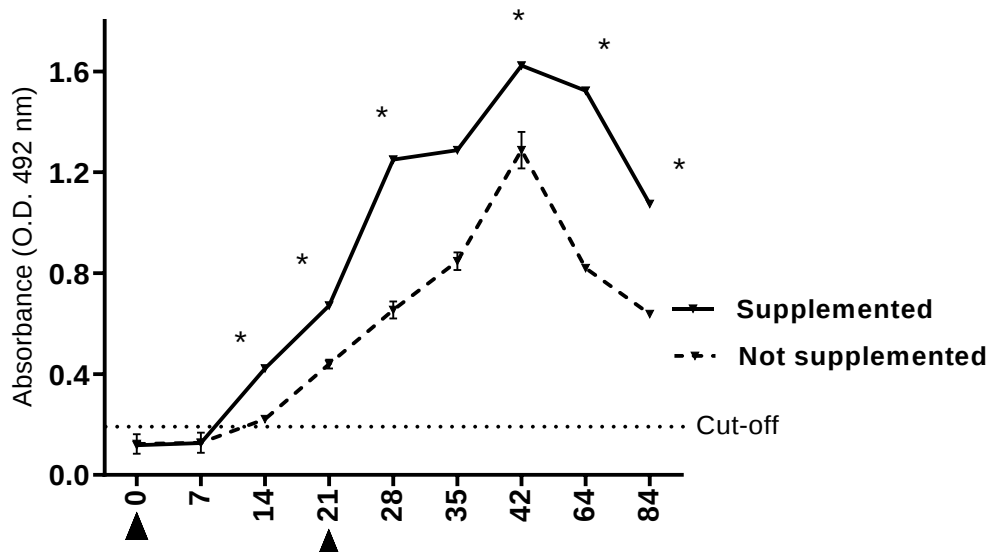


Figure 1. Kinetics of rTCHB-specific total IgG. The data represent the mean ($\pm$ SEM) of the ELISA values obtained in the analysis of individual sera in anti-rTCHB specific IgG absorbance in supplemented and non-supplemented animals. Arrow heads indicate vaccination dates. Asterisk (*) represents the statistical difference ($p < 0.05$) between the supplemented and non-supplemented groups, evaluated by Two-Way ANOVA followed by SIDAK for multiple comparison tests.

In the titration of specific antibodies against rTCHB on day 42 of the experiment, it was observed by ELISA values that the supplemented group presented titers of 800 while the controls (not supplemented) obtained titers of 400 (Figure 3).

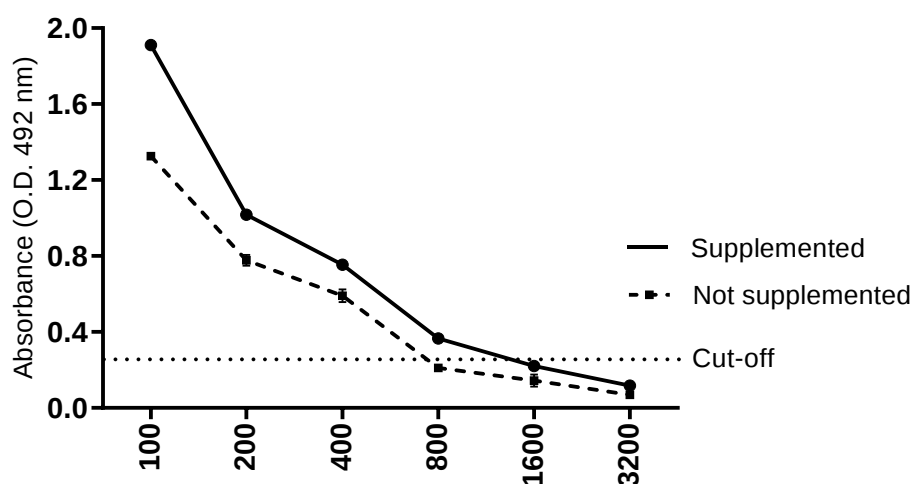


Figure 2. Titration of specific anti-rTCHB total IgG. The data represent the means of anti-rTCHB specific IgG ELISA values in pooled sera from supplemented and non-supplemented animals on day 42 of the experiment.

Na caracterização da resposta IgG foram avaliados os isotipos IgGa (IgG1), IgGb (IgG4/7) e IgGT (IgG3/5), nas coletas realizadas nos dias 42 e 64 do experimento. No grupo suplementado (FIGURA 3a), se observa uma predominância dos isotipos IgGb (3/5) com níveis superiores aos do grupo controle, sendo o isotipo responsável pelo pico de resposta dos IgGs específicos totais no grupo suplementado. O isotipo IgG1 também foi superior no grupo suplementado no dia 42, tendo uma queda em ambos os grupos pro dia 64, porém com o grupo suplementado mantendo -se com níveis superiores ao grupo não suplementado, e foi o isotipo predominante no grupo não suplementado (Figura 3a e 3b). O isotipo IgGT (4/7) foi o isotipo obteve maiores níveis no grupo não suplementado (Figura 3b).

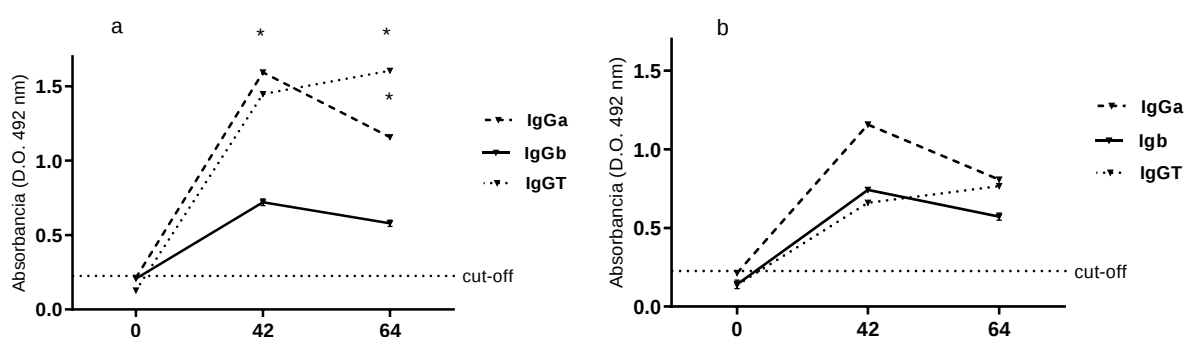


Figure 3. Assessment of specific anti-rTENT IgGa, IgGb and IgGT sub-isotypes. The data represent the means (+/- SEM) of the absorbance values of the anti-rTENT specific IgG sub-isotypes in two pooled sera from each group supplemented and non-supplemented. Being (a) group supplemented, (b) group non-supplemented. Asterisk (*) represents the statistical difference (SIDAK, $p < 0.05$) between the supplemented and non-supplemented group, on experimental days 42 and 64 and (#) represent statistical difference in IgGa between day 42 and day 64 in the supplemented group.

Resposta celular. As células polimorfo nucleares do sangue periférico foram cultivadas e estimuladas com o *B. toyonensis* BCT-7112 (Figura 5a) e com o rTCHB (Figura 5b) e analisadas quanto à transcrição relativa do mRNA para as citocinas *IL1*, *IL4*, *IL10* e *TNF- α* no dia 35 ou 42 do experimento (Figura 5). O estímulo com *B. toyonensis* induziu níveis de transcrição de mRNA significativamente elevados ($p < 0,05$) de *IL1* (~14,5 vezes), *IL 4* (~6.5 vezes), *IL10* (~7,0), *TNF- α* (~8,5 vezes) quando comparados com as células dos animais não suplementados (Figura 5a). Na avaliação de expressão relativa de mRNA das células estimuladas com o antígeno vacinal, pode ser observado que das citocinas avaliadas a *IL10* foi a de maior diferença entre os grupos, chegando a ~13 vezes superior no grupo suplementado quando comparadas ao grupo não suplementado (Figura 5b).

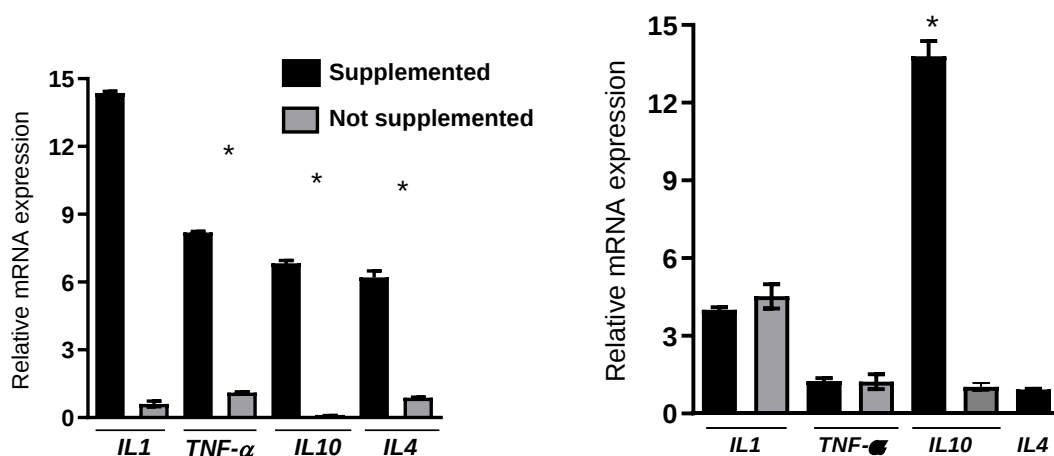


Figure 4. Relative transcription of the cytokines *IL1*, *IL4*, *IL10* and *TNF-α*. Data represent individual means ($\pm$ SEM) of cytokine transcription in PBMCs stimulated with *B. toyonensis* BCT-7112 (a), recombinant antigen – rTCHB (b) in the supplemented and non-supplemented group on day 37 of the experiment. Asterisks (*) represent statistical difference ($p < 0.05$, by Two-Way ANOVA followed by SIDAK for multiple comparison tests) between the supplemented and non-supplemented groups.

DISCUSSÃO

A vacinação é um dos métodos mais eficazes para prevenir as clostridioses, as vacinas estimulam o sistema imunológico a identificar e erradicar patógenos potencialmente fatais, como as espécies de *Clostridium* (Khiav ate al., 2021). Em nosso estudo observamos que em ambos os grupos vacinados responderam a vacinação. Mundialmente, há uma grande variedade de vacinas toxóide clostridiais ou bacterina-toxóide para a proteção dos animais, as produções em larga escala seguem inalteradas desde 1900, no entanto, já foi comprovado que as nanovacinas e as vacinas recombinantes são eficazes e podem ser alternativas potenciais às convencionais (Khiav ate al.,2021). Visando minimizar riscos de biossegurança, e os exigentes meios e condições de cultivos dos clostrídeos necessários nos métodos tradicionais, os antígenos recombinantes vêm sendo pesquisados como alternativa promissora na utilização de vacinas (MOREIRA et al., 2018).

A suplementação com o *B. toyonensis* BCT-7112 vem demonstrando ser uma opção válida no aumento da resposta vacinal, principalmente considerando as vacinas com antígenos recombinantes (Santos et al., 2021). Durante o período experimental, não foram observados efeitos adversos a suplementação com *B. toyonensis* BCT-7112. Esses resultados são similares aos observados em

estudos realizados por nosso grupo com *B. toyonensis* em outras espécies (ex. Ovinos, suínos e aves) (Santos et al., 2021; Franz et. al, 2020; Santos et al., 2018). Entretanto, nossos achados diferem dos reportados por John et al., (2015), que reportaram uma tendência a diarreia em potros suplementados com *B. toyonensis*, por um período de 2 meses de suplementação.

Neste estudo observamos o efeito imunomodulador do *B. toyonensis* BCT-7112 na resposta vacinal em equinos com antígeno recombinante da hemoglobínúria bacilar, confirmando que o grupo já havia reportado utilizando diferentes antígenos em diferentes espécies (Santos et al., 2021; Franz et. al, 2020; Santos et al., 2018). Estudos anteriores demonstraram que a suplementação com *B. toyonensis* e sua presença nas fezes dos animais corroboram com a literatura confirmado sua presença no trato gastrointestinal, e o seu papel imunomodulador na resposta vacinal. Observamos que os níveis de anticorpos específicos contra o rTCHB nos animais suplementados foram significativamente superior a partir do dia 14 pós primo vacinação, e se mantiveram superiores até o dia 84 do experimento comparados com os animais não suplementados. Essa observação vem de encontro com nossa hipótese que o estímulo do probiótico se dá já na primo-vacinação amplificando a resposta vacinal através da expressão de citocinas. Entretanto, sua contínua suplementação se torna importante para a resposta anamnésica vacinal e a modulação da resposta imune vacinal. O efeito probiótico é observado na dinâmica da resposta vacinal na qual as curvas apresentam a mesma tendência, entretanto o grupo suplementar sempre significativamente superior. A titulação confirma os resultados encontrados na dinâmica de IgGs totais, sendo 1:800 no grupo suplementado e 1:400 no grupo não suplementado.

Na resposta anamnésica, podemos sugerir que o grupo suplementado por ter alcançado um nível de anticorpos maiores, nos suplementados observamos 4,5 valores de ELISA enquanto nos controles 0,2 valores de ELISA. Esses achados demonstram o efeito imuno mediador do probiótico na resposta vacinal. Interessante, é que os níveis de anticorpos após 35 dias se mantem novamente com a mesma tendencia de aumento, mas sempre com o grupo suplementado superior (Figura1). tais níveis se mantiveram por maior período. Tal tendência foi observada ao nos níveis de IgGs totais específicas contra o rTCHB, esses dados corroboram com os de Santos et al. (2021), que relatou uma diferença significativa já na primeira dose vacinal administrada nos animais suplementados com *B. toyonensis* BCT-7112 comparando com os controles, sugerindo um efeito imuno modulador já na primo sensibilização vacinal. Nos trabalhos realizados por Santos et al., 2021, com antígenos clostridiais em ovinos foi observado maiores níveis de IgGs totais específicos e maior soroneutralização nas ovelhas suplementadas com *B. toyonensis*, o que pode sugerir uma correlação positiva.

As subclasses de IgG podem ser indicadores indiretos de respostas de linfócitos T e podem indicar resposta imune direcionada para o tipo linfócitos T auxiliares (ex. Th1, Th2, Treg, etc.) (Estes et al., 2002). Os isotipos IgG_a (IgG1) e IgG_b (IgG4/7) são atribuídas a capacidade de fixar complemento e mediar a citotoxicidade celular dependente de anticorpos, sendo a IgG_T (IgG3/5) eficiente na neutralização de toxinas como as de *Clostridium* sp. (Lewis et al., 2008). Nos animais suplementados foi observado uma co-predominância do isotipo IgG_T (3/5) e IgG_a(1), responsável pelo pico de IgGs totais específicas observado dependendo do dia do experimento, IgG_a com níveis

suéiores no dia 42 e IgGT(3/5) predominante no dia 64, podendo indicar uma resposta anamnésica no grupo suplementado. Esse resultado sugere que a imunomodulação de IgGT (3/5) foi mediada pelo *B. toyonensis* BCT-7112, pois, em estudos anteriores foi o isotipo com menores valores de ELISA em equinos vacinados com antígenos convencionais (*Streptococcus equi*) e recombinantes (*Theileria equi*) (Santos et al., 2021).

Observando a dinâmica da IgGT(3/5), sugere-se uma amplificação mediada pelo *B. toyonensis*, já que aos 42 e 64 dias houve um aumento 1,3 vezes maior do grupo suplementado comparado ao grupo controle, fazendo uma curva crescente. A IgG3 é a subclasse com maior capacidade de desencadear explosão respiratória via ligação com receptores Fc (LEWIS et al., 2008), e possui maior capacidade de neutralização de toxinas, o que é desejável na imunização contra β toxina do *Clostridium haemolyticum*. A suplementação com o probiótico deu origem à uma resposta com as duas vias de combate à patógenos do organismo, montando uma resposta mista Th1/Th2.

Os mecanismos de ação que envolvem a modulação da resposta imune por probióticos não é totalmente esclarecida. A capacidade do probiótico modular o trato gastrointestinal está associada à mucosa do sistema imune local, a imunomodulação é um processo altamente complexo que resulta da interação entre o probiótico, microbiota intestinal, epitélio TGI e as células imunes associadas ao TGI (Begum et al., 2021). A interação de probióticos com células intestinais epiteliais, células dendríticas e linfócitos (Bermudees-Brito et al., 2012) induzem uma modulação da resposta imune, inata e adaptativa, podendo aumentar a produção de citocinas polarizando as respostas dos linfócitos T auxiliares em Th1, Th2 e/ou Treg (Lebeer et al., 2010). A transcrição relativa de citocinas observadas nas PBMCs dos equinos suplementados com o *B. toyonensis* BCT-7112 pode ser um fator chave para entender a modulação da resposta vacinal. PBMCs dos animais suplementados e estimuladas com o *B. toyonensis* tiveram uma transcrição superior de mRNA para *IL1*, *TNF- α* , *IL4* e *IL10*. Desta forma, nossos resultados sugerem que as citocinas tiveram papel importante no aumento da imunogenicidade da vacina recombinante experimental contra o tétano nos animais suplementados.

IL-1 e *TNF- α* são citocinas que no grupo suplementado, quando estimuladas com o *B. toyonensis*, tiveram um aumento significativo em suas transcrições, ~14,4 e 8,5 vezes respectivamente, quando comparados ao grupo controle. Há evidências de que a sinalização mediada por IL1 em células dendríticas contribui para sua maturação, migração e acúmulo em órgãos linfoides, e exerce papel na ativação secundária durante a comunicação entre células dendríticas e linfócitos T (Wajant et al., 2007). Assim, podendo desempenhar um papel importante na imunogenicidade de antígeno vacinal (Eeckhout et al., 2021). O Fator de Necrose Tumoral α é a citocina de maior ação pró inflamatória e tem sido relacionada a atividade adjuvante (Brunner et al., 2000; Kayamuro et al., 2009). É reconhecido que o *TNF- α* desempenha um papel importante na defesa do hospedeiro, ativando a imunidade inata e adaptativa, induzindo a maturação de células dendríticas e ativação de linfócitos T (Wajant et al., 2007).

IL4 e uma citocina Th2 e a IL10 uma citocina Treg anti-inflamatória, IL4 indica a presença de populações de linfócitos que foram diferenciados em Th2, a qual é fundamental para a resposta imune humoral, pois favorece a produção de anticorpos (Parkin 2001; Paul, 2010). A IL4

desempenha papel essencial na estimulação de linfócitos B na mudança de classe de IgG, e também é responsável por ativar células imunes inatas, como os basófilos e mastócitos (Paul, 2010). A IL10 tem sua ação reguladora já bastante conhecida, porém há a descrição de que esta citocina pode também atuar estimulando a proliferação de linfócitos B estimulando a produção de anticorpos (Paul and Zhu, 2010). O grupo suplementado apresentou um aumento na transcrição de mRNA de *IL4* e *IL10* de ~6,3 vezes, e de ~7,0 vezes, respectivamente. quando estimulado com *B. toyonensis* BCT-7112, na estimulação com o antígeno vacinal a transcrição relativa de mRNA foi similar nos grupos quanto a *IL1*, *TNFα* e *IL4*, a transcrição relativa de *IL10* no grupo suplementado foi ~13 x superior que no grupo não suplementado, podendo sugerir, por ser uma citocina regulatória, que pode ter inibido a reação das outras citocinas testadas. Os efeitos supressores da IL10 sobre células dendríticas e macrófagos causam inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e, consequentemente, diminuição do desenvolvimento de células Th1 (Wagner et al., 2008). Esses achados sugerem um provável mecanismo envolvido no efeito da resposta vacinal nos animais suplementados com *B. toyonensis* venha ser mediado pelas citocinas avaliadas nesse estudo.

CONCLUSION

Os dados apresentados neste estudo demonstraram que a suplementação com *B. toyonensis* BCT-7112 modula e melhora a resposta imune à vacina experimental recombinante contra *Clostridium haemolyticum* em equinos. Nossos resultados sugerem que *B. toyonensis* BCT-7112 têm um efeito modulador ampliando a resposta imune, confirmando que sua utilização é uma estratégia para melhorar a resposta vacinal em equinos. No entanto, mais estudos são necessários para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na imunomodulação mediada por *B. toyonensis* BCT-7112 em equinos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FRANZ, H. C.; CONRAD, N. L.; SANTOS, F. D. S.; GONCALVES, V. S.; FONSECA, R. N.; BRASIL, C. L.; HUBNER, S. O.; FÁBIO P. L. Leite . Immunomodulatory effect of *Bacillus toyonensis* BCT7112 supplementation in puppies vaccinated against canine parvovirus. PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA (ONLINE), v. 40, p. 897-902, 2020.
- FONG, F.L.Y., SHAH, N.P., KIRJAVAINEN, P. & EL-NEZAMI, H. (2016). Mechanism of Action of Probiotic Bacteria on Intestinal and Systemic Immunities and Antigen-Presenting Cells. *International Reviews of Immunology*. 35(3). p. 179–188
- LIVAK, KJ, SCHMITTGEN, TD. Análise de dados de expressão gênica relativa usando PCR quantitativo em tempo real e o método 2- $\Delta\Delta$ CT Methods, 25 (2001), pp. 402 - 408,10.1006/met.2001.1262
- Filho, Flávio Obino; In:Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2014.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo demográfico: resultados finais-Brasil , 2019.<https://www.ibge.gov.br>
- NAVARRO, MAURÍCIO A. & UZAL, FRANCISCO A. Pathobiology and diagnosis of clostridial 649 hepatites in animals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. Vol 32(2). Pag 650 192-202> 2020.
- MOREIRA JR, C; FERREIRA, M.R.A; DA CUNHA, C.E.P; DONASSOLO, R.A; FINGER, P.F; MOREIRA, G.M.S.G; OTAKA, D.Y; DE SOUZA, L.A; BARBOSA, J.D; MOREIRA, A.N; SALVARANI, F.M; CONCEIÇÃO, F.R. Immunogenicity of a Bivalent Non-Purified Recombinant Vaccine against Botulism in Cattle. *Toxin*, v. 10, n. 381, 2018.
- JOHN, J.; ROEDIGER, K.; SCHROEDL, W.; ALDAHER, N.; VERVUERT, I. Development of intestinal microflora and occurrence of diarrhea in sucking foals: effects of *Bacillus cereus* var. *toyoi* supplementation. *BMC Veterinary Research*. v.11, n 35, 2015.
- Popoff MR . Tétano em animais . *J Vet Diag* 2020 ; 32 : 184 – 191
- SANTOS, F. D. S.; FERREIRA, M. R. A.; MAUBRIGADAS, L.R.; GONÇALVES, V.S.; DE LARA, A.P.S.; MOREIRA, F.M.; CONCEIÇÃO, F.R.; LEITE, F., P. L. *Bacillus toyonensis* BCT-7112 T transient supplementation improves vaccine efficacy in ewes vaccinated against *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY*, v. 130, p. 699-706, 2021.a
- SANTOS, F. D. S.; MAUBRIGADES, LUCAS REICHERT; GONÇALVES, VITÓRIA SEQUEIRA; FRANZ, HELEN CABALDI; RODRIGUES, PAULO RICARDO CENTENO; CUNHA, RODRIGO CASQUERO; FÁBIO P. LEIVAS LEITE . *Bacillus toyonensis* BCT-7112T Spores as Parenteral Adjuvant of BoHV-5 Vaccine in a Murine Model. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 13, p. 655-663, 2021.
- SANTOS, F. D. S.; MAUBRIGADES, L. R.; GOLÇALVES, V. S.; FERREIRA, M. R. A.; BRASIL, C. L.; CUNHA, R. C.; CONCEIÇÃO, F. R.; LEITE, F. P. L. L. Immunomodulatory effect of short-term supplementation with *Bacillus toyonensis* BCT-7112 and *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 in sheep vaccinated with *Clostridium chauvoei*. *Veterinary Immunopathology*, v.34, n. 237, 2021.
- SANTOS, A. C.; NOGUEIRA, C. E. W.; MORAES, B. S. S.; MÜLLER, V.; MOUSQUER, M. A.; LEITE, F. P. L. L. Immune response of adults horses, pregnant mares and foals to an experimental vaccine with recombinant EMA-2 protein of *Theileria equi*. *Research in Veterinary Science*. v. 139, n. 186, 2021.
- FERREIRA, M. R. A.; MOREIRA, G. M. S. G.; CUNHA, C. E. P.; MENDONÇA, M; SALVARANI, F. M.; MOREIRA, A. N.; CONCEIÇÃO, F. R. Recombinant Alpha, Beta, and Epsilon Toxins of *Clostridium perfringens*: Production Strategies and applications as Veterinary Vaccines. *Toxins*, v. 8, n. 340, 2016.
- ESTES, D. M.; BROWN, W., L. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v. 90, n.10, 2002.
- SLACK, J.; RISDAHL, J. M.; VALBERG, S. J.; MURPHY, M. J.; SCHRAM, B. R.; LUNN, P. D. Effects of dexamethasone on development of immunoglobulin G subclass responses following vaccination of horses. *AJVR*. v.61. n. 12, 2000.
- BANNAI, HIROSHI; NEMOTO, MANABU; TSUJIMURA, KOJI; TAKASHI, YAMANAKA; KOKADO, HIROSHI; KONDO, TAKASHI; MATSUMURA, TOMIO. Comparison of protective efficacies between intranasal and intramuscular vaccination of horses with a modified live equine herpes virus type-1 vaccine. *Veterinary Microbiology*, vol 222, p.18-24, Agosto de 2018 <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/equinos/br>
- YOUSTEN, A. A., 1984. *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. *Adv. Biotechnol. Process*. 3, 315–343.
- MEEUSEN EN, WALKER J, PETERS A, PASTORET PP, JUNGENSEN G. Situação atual das vacinas veterinárias. *Clin Microbiol Rev*. (2007) 20:489–510. DOI: 10.1128/CMR.00005-07
- Khiav, L., Zahmatkesh, A. Vaccination against pathogenic clostridia in animals: a review. *Trop Anim Health Prod* 53, 284 (2021).

BEGUM, J., BUYAMAYUM, B., LINGARAJU, M. C. 3, KAPIL DEV 3, AVISHEK BISWAS. Probiotics: Role in immunomodulation and consequent effects. Probiotics and immunity. V.1, n1, 2021.

BEGUM, J., BUYAMAYUM, B., LINGARAJU, M. C., KAPIL D., Avishek Biswas. Probiotics: Role in immunomodulation and consequent effects. Probiotics and immunity. V.1, n1, 2021.

ZENDEBOODI, F., KHORSHIDIAN, N., MORTAZAVIAN, A M, CRUZ, A G., Probiotic: conceptualization from a new approach, Current Opinion in Food Science, v. 32, Pag 103-123, 2020.

VAN DEN EECKHOUT B, TAVERNIER J AND GERLO S (2021) Interleukin-1 as Innate Mediator of T Cell Immunity. Front. Immunol. 11:621931. doi: 10.3389/fimmu.2020.621931) Hepatite necrótica infecciosa causada por Clostridium novyi tipo B em cavalo: relato de caso e revisão da literatura. J Vet Diagn Invest. Março de 2018; 30(2):294-299. DOI: 10.1177/1040638717737125. Epub 2017 10 dez. PMID: 29224513; PMCID: PMC6505884.

SANTOS, FDS, MAUBRIGADES, LR., GONÇALVES, SV. , FERREIRA, MRA., BRASIL, CL., CUNHA, RC., CONCEIÇÃO, FR., LEIVAS, FP. Immunomodulatory effect of short-term supplementation with Bacillus toyonensis BCT 7112T and Saccharomyces boulardii CNCM I-745 in sheep vaccinated with Clostridium chauvoei Leite DAVIES JL, UZAL FA, WHITEHEAD AE. Necrotizing hepatitis associated with Clostridium novyi in a pony in western Canada. Can Vet J. 2017 Mar;58(3):285-288. PMID: 28246418; PMCID: PMC5302206.

K. L. HEPWORTH-WARREN, B. L. HAY KRAUS, D. M. WONG, A. C. KRULL, G. L. Metcalf. Septic peritonitis in a Percheron mare associated with Clostridium haemolyticum, 2016

5 Considerações Finais

A suplementação com o *B. toyonensis* foi bem tolerada por equinos, não sendo observado nenhum efeito adverso nos 42 dias de suplementação, nem nos 40 dias seguintes. O melado foi um bom veículo de administração, mantendo a viabilidade dos esporos do *B. toyonensis* e facilitando a ingestão dos equinos. O efeito imunomodulador do *B. toyonensis* em equinos no estímulo da resposta às vacinas clostridiais recombinantes testadas foi confirmado, aumentando os níveis de anticorpos específicos totais e os isotipos de IgGs, tendo a modulação nos isotipos IgGa e IgGT. Estimulando uma resposta mista Th1 e Th2. A modulação do probiótico testado na expressão relativa de citocinas pode ser observado nos ensaios realizados em PBMCs. Mais estudos podem ser realizados, diminuindo o período de suplementação e com diferentes antígenos para uma maior compreensão do potencial do *B. toyonensis* em equinos e na forma como pode ser suplementado.

Os potros de dois meses de vida vacinados com vacina recombinante de toxina tetânica tiveram resposta humoral similares aos cavalos adultos. Tanto dos IgGs totais quanto nos subtipos de IgGs, o que nos sugere que a resposta humoral de potros de 2 meses frente à vacinação pode ser viável, podendo variar com o antígeno e tipo de vacina. Porém, mais estudos são necessários com outros antígenos e um maior aprofundamento para aumentar o entendimento sobre a vacinação nesta categoria de equinos.

Referências

AIDA, V., NEASHAM, P.J., KIRKLIN, J.F.N., SHENIQUA, L.M., R. GLOVER, C.S. KYRIAKIS, GCS. Novel Vaccine Technologies in Veterinary Medicine: A Herald to Human Medicine Vaccines. Sec. Doenças Infecciosas Veterinárias. Volume 8 – 2021

MEEUSEN EN, WALKER J, PETERS A, PASTORET PP, JUNGENSEN G. Situação atual das vacinas veterinárias. Clin Microbiol Rev. (2007) 20:489– 510. DOI:181010.1128/CMR.00005-07

KHIAV, L., ZAHMATKESH, A. Vaccination against pathogenic clostridia in animals: a review. Trop Anim Health Prod 53, 284 (2021).

BEGUM, J., BUYAMAYUM, B., LINGARAJU, M. C., KAPIL D., Avishek Biswas. Probiotics: Role in immunomodulation and consequent effects. Probiotics and immunity. V.1, n1, 2021.

ZENDEBOODI, F., KHORSHIDIAN, N., MORTAZAVIAN, A M, CRUZ, A G., Probiotic: conceptualization from a new approach, Current Opinion in Food Science, v. 32, Pag 103-123, 2020.

LEWIS, MJ. As diferentes capacidades de função efetora das sete subclasses de IgG equina têm implicações para estratégias de vacinas Mol. Immunol. (2008)

LEWIS, MJ. IgA no cavalo: clonagem de receptor polimérico de Ig equina e cadeia J e caracterização de formas recombinantes de IgA equina Immunol da mucosa. (2010)

HAUER, P.J. , YEARY, T.J., ROSENBUSCH, R.F. Evidence of the protective immunogenicity of native and recombinant Clostridium haemolyticum phospholipase C (beta toxin) in guinea pigs, Vaccine, v.24, c2, Pag 124- 132, 2006,

YOUSEFI, B., ESLAMI, M., GHASEMIAN, A., KOKHAEI, P., SALEK FARROKHI, A. & DARABI, N. (2019). Probiotics importance and their immunomodulatory properties. Journal of Cellular Physiology. 234(6). p. 8008– 8018.

HABIL, N.Y. (2015). Probiotic Induce Macrophage Cytokine Production Via Activation of STAT-3 Pathway. Automation, Control and Intelligent Systems. 3(2).

MEDZHITOV, R. & JANEWAY JR., C. (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev.* 173. p. 89–97. Available http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt Citation&list_uids=10719670

HIDALGO-CANTABRANA, C., NIKOLIC, M., LÓPEZ, P., SUÁREZ, A., MILJKOVIC, M., KOJIC, M., MARGOLLES, A., GOLIC, N. & RUAS-MADIEDO, P. (2014). Exopoly saccharideproducing *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strains and their polymers elicit different responses on immune cells from blood and gut associated lymphoid tissue. *Anaerobe.* 26:47

ZHONG, Y., WANG, S., DI, H., DENG, Z., LIU, J. & WANG, H. (2022). Gut health benefit and application of postbiotics in animal production. *Journal of Animal Science and Biotechnology.* 13(1). p. 1–12

WAGNER, B. Anticorpos IgE monoclonais anti-equinos com especificidade para diferentes epítomos na cadeia pesada da imunoglobulina da IgE nativa *Veterinario. Imunol. Imunopatol.* (2003)

WAGNER, B. Imunoglobulinas e genes de imunoglobulinas do cavalo *Dev. Comp. Imunol.* (2006).

DOWDALL, SMJ. Respostas antigênicas específicas de IgG(T) na infecção natural e experimental por ciatostimíminas em cavalos *Veterinario. Parasitol.* (2002)

DING S, YAN W, MA Y, FANG J. The impact of probiotics on gut health via alternation of immune status of monogastric animals. *Animal Nutrition* 7: 24-30. (2021). <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.11.004>

LAUKOVA, A., MICENKOVA, L., KUBASOVA, I. et al. Microbiota, Atividade Fagocítica, Parâmetros Bioquímicos e Controle de Parasitas em Equinos com Aplicação de Cepa Autóctone, Produtora de Bacteriocina, Probiótica *Enterococcus faecium* EF 412. *Probióticos & Antimicro. Prot.* 15, 139-148 (2023). <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09918-4>.

KANTAS, D., PAPATSIROS, V.G., TASSIS, P.D., GIAVASIS, I., BOUKI, P. A feed additive containing *Bacillus toyonensis* (Toyocerin) protects against enteric pathogens in postweaning piglets and E.D. Tzika 2014.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; BENDER, K.; BUCKLEY, D.; STAHL, D. *Microbiologia de Brock.* 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

ALOUF, J.; LADANT, D.; POPOFF, M. R. *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins.* 4. ed. Amsterdam: Elsevier, 2015.

LOBATO FCF. et al. Clostridioses dos animais de produção *Vet. e Zootec.* 2013; 20(Edição Comemorativa): 29-ISSN Impresso 0102 -5716 ISSN Eletrônico 2178-3764 *Veterinária e Zootecnia.*

NYAOKE AC, NAVARRO MA, BEINGESSER J, UZAL FA. Infectious necrotic hepatitis caused by *Clostridium novyi* type B in a horse: case report and review of the literature.

J Vet Diagn Invest. 2018 Mar;30(2):294-299. doi: 10.1177/1040638717737125. Epub 2017 Dec 10. PMID: 29224513; PMCID: PMC6505884.

VAN GALEN, G. Retrospective evaluation of 155 adult equids and 21 foals with tetanus in Western, Northern, and Central Europe (2000–2014). Part 1: Description of history and clinical evolution. Journal of veterinary emergency and critical care, v. 27, n. 6, p. 684-696, 2017.

CLAESSON, MJ CUSACK, S, O'SULLIVAN, O O'TOOLE, W. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. Biological Sciences, v108. Pag 4585-4591.2010.

GANAL-VONARBURG, SC, DUERR, CU. The interaction of intestinal microbiota and innate lymphoid cells in health and disease throughout life. Immunology. v159, pag1-129, 202

Anexo

Anexo A - Parecer de Aprovação CEUA



PARECER Nº

23/2021/CEEA/REITORIA

PROCESSO Nº

23110.006729/2021-81

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Efeito imunomodulador de *Bacillus toyonensis* em equinos vacinados contra *Streptococcus equi* subespécie equi**”, registrada com o nº 23110.006729/2021-81, sob a responsabilidade de Fábio Pereira 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 **06 de abril de 2021**.

Finalidade	(x) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	15/04/2021 a 15/04/2023
Espécie/linhagem/raça	Equinos/Mestiços
Nº de animais	20
Idade	3-10 anos
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Centro de Ensino e Experimentação em Equinocultura da Palma (CEEPE) UFPel - Capão do Leão

Código para cadastro nº CEEA 6729-2021

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

https://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=1434674&infra_sist...

Presidente da CEEA



Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX, Médico Veterinário**, em 09/04/2021, às 15:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1264538** e o código CRC **33EC3D3B**.

Referência: Processo nº 23110.006729/2021-81

SEI nº 1264538