

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



Dissertação

**Avaliação do efeito imunomodulador de *Bacillus toyonensis* em cães
vacinados contra Parvovírus**

Helen Cabaldi Franz

Pelotas, 2019

Helen Cabaldi Franz

**Avaliação do efeito imunomodulador de *Bacillus toyonensis* em cães
vacinados contra Parvovírus**

Dissertação 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 Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia de Oliveira Hübner

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F838a Franz, Helen Cabaldi

Avaliação do efeito imunomodulador de *Bacillus toyonensis* em cães vacinados contra Parvovírus. / Helen Cabaldi Franz ; Fábio Pereira Leivas Leite, orientador ; Silvia de Oliveira Hübner, coorientadora. — Pelotas, 2019.

68 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Probióticos. 2. Vacinação. 3. Imunomodulação. 4. Anticorpos. I. Leite, Fábio Pereira Leivas, orient. II. Hübner, Silvia de Oliveira, coorient. III. Título.

CDD : 636.7

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Helen Cabaldi Franz

Avaliação do efeito imunomodulador de *Bacillus toyonensis* em cães vacinados
contra Parvovírus

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

Data da Defesa: 18/02/2019

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (Orientador)
Doutor em Ciências Veterinárias pela University Wisconsin-Madison

Prof^a. Dr^a. Marlete Brum Cleff
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Fabrício Rochedo Conceição
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Cristiano Silva da Rosa
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me concedido saúde e sabedoria para chegar ao final de mais um desafio.

A minha família que, com muito amor, não mediu esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao meu esposo que, de forma especial e carinhosa, me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades.

Aos professores, por me transmitirem conhecimento e contribuírem com meu crescimento profissional, em especial ao meu orientador Fábio Pereira Leivas Leite pela sua disponibilidade e por dirigir-me os passos para o alcance dos meus objetivos e a minha coorientadora Silvia de Oliveira Hübner pelo apoio no trabalho e por suas tão inteligentes observações e correções.

As equipes dos Laboratórios 4 e 11 por terem me recebido com tanto carinho, pelos ensinamentos e por me mostrarem a importância de se trabalhar em equipe.

Aos colegas e amigos, Francisco Denis Souza Santos, Vitória Sequeira Gonçalves, Carolina Litchina Brasil e Renata Nobre da Fonseca pela motivação e amizade. Sem vocês esse trabalho não seria possível... E também não seria tão prazeroso!

A professora Luciana Bicca Dode e a Maria Eduarda Bicca Dode pela confiança no meu trabalho e por tornarem a manipulação dos filhotes um momento tão agradável.

Ao Laboratório de Virologia e ao laboratório de Patologia Clínica Veterinária por toda a ajuda e contribuição no trabalho.

A cachorrinha Luna (*in memorium*) por ter me proporcionado o prazer de ter estado no seu convívio.

Muito obrigada!

***"Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal,
ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante."
Albert Schweitzer***

Resumo

FRANZ, Helen Cabaldi. **Avaliação do efeito imunomodulador de *Bacillus toyonensis* em cães vacinados contra Parvovírus.** 2019. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas promovem benefícios à saúde do hospedeiro. Os mecanismos de ação dos probióticos incluem fatores que aprimoram as defesas naturais do organismo, dentre estes é possível citar a modulação da resposta imune. *Bacillus toyonensis* é um microrganismo probiótico que há décadas vem sendo utilizado na nutrição animal ao redor do mundo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito imunomodulador da suplementação com o probiótico *B. toyonensis* para cães que foram vacinados contra parvovirose. 10 cães da raça *Australian Cattle Dog*, provenientes de duas ninhadas, com 45 dias foram selecionados aleatoriamente para compor dois grupos, onde um grupo recebeu via oral *B. toyonensis* na concentração 2×10^8 esporos viáveis por dia durante 35 dias e para o outro grupo foi administrado apenas solução salina fosfatada. Os cães foram vacinados contra parvovírus canino tipo 2 nos dias 7 e 28 do experimento e, foram realizadas coletas de sangue nos dias 0, 7, 21 e 35 do experimento. Os níveis de anticorpos IgG totais específicos contra o antígeno foram determinados por ELISA indireto. A suplementação com *B. toyonensis* foi eficiente em estimular a produção de títulos de anticorpos 4 vezes superiores ($p < 0,05$) quando em comparação aos animais do grupo controle em todos os dias analisados. Os hemogramas mostraram um perfil hematológico esperado para a espécie e idade dos animais. Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de cães foram cultivadas e estimuladas com DNA, célula vegetativa e esporos de *B. toyonensis*. Por qPCR foi avaliada a transcrição de mRNA das citocinas IL-4, IL-17, e IFN- γ nas PBMCs. Os esporos de *B. toyonensis* induziram a transcrição de mRNA de IL-4 (4,4 vezes), IL-17 (1,3 vezes) e IFN- γ (1,6 vezes), o DNA obteve IL-4 (4,7 vezes), IL-17 (3,5 vezes) e IFN- γ (2 vezes) e as células vegetativas foram responsáveis por induzir IL-4 (1,7 vezes), IL-17 (3,15 vezes) e IFN- γ (1,2 vezes). Sendo assim, concluímos neste estudo que a suplementação com *B. toyonensis* pode amplificar a resposta imune vacinal contra a parvovirose em cães.

Palavras-chave: probióticos; vacinação; imunomodulação; anticorpos

Abstract

FRANZ, Helen Cabaldi. **Evaluation of the immunomodulatory effect of *Bacillus toyonensis* in dogs vaccinated against parvovirus.** 2019. 68f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Probiotics are live microorganisms that when administered in adequate quantities promote health benefits to the host. The mechanisms of action of probiotics include factors that enhance the body's natural defenses, among which it is possible to cite the modulation of the immune response. *Bacillus toyonensis* is a probiotic microorganism that for decades has been used in animal nutrition around the world. The objective of this work was to evaluate the immunomodulatory effect of probiotic *B. toyonensis* supplementation for dogs that were vaccinated against parvovirus. 10 *Australian Cattle Dog* dogs from two litters with 45 days were randomly selected to form two groups, where one group received oral *B. toyonensis* at a concentration of 2×10^8 viable spores per day for 35 days and for the other group only phosphate saline was administered. Dogs were vaccinated against canine parvovirus type 2 on day 7 and 28 of the experiment, and blood samples were collected on days 0, 7, 21 and 35 of the experiment. Total antigen-specific IgG antibody levels were determined by indirect ELISA. *B. toyonensis* supplementation was efficient in stimulating the production of higher antibody titers 4 times higher ($p < 0.05$) when compared to control animals on all days analyzed. The hemograms showed an expected hematological profile for the species and age of the animals. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from dogs were cultured and stimulated with DNA, vegetative cell and *B. toyonensis* spores. By qPCR the mRNA transcription of cytokines IL-4, IL-17, and IFN- γ in PBMCs was evaluated. *B. toyonensis* spores induced IL-4 (4.4-fold), IL-17 (1.3-fold) and IFN- γ (1.6-fold) mRNA transcription, the DNA obtained IL-4 (4.7 fold), IL-17 (3.5-fold), and IFN- γ (2-fold), and the vegetative cells were responsible for inducing IL-4 (1.7-fold), IL- IFN- γ (1.2 fold). Thus, we conclude in this study that *B. toyonensis* supplementation may amplify the vaccine immune response against parvovirus in dogs.

Keywords: probiotics; vaccination; immunomodulation; antibodies

Lista de Figuras

Artigo 2

- Figura 1 Níveis de IgG totais das diluições dos soros de cães vacinados contra parvovírus canino. Os dados foram representados como os valores das médias dos grupos das diluições no dia 35 na absorbância de 492nm. A análise estatística foi realizada pelo teste two-way ANOVA seguido de teste de Tukey. Os asteriscos significam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais..... 46
- Figura 2 Dinâmica dos níveis de IgG totais de cães vacinados contra parvovírus canino. Os dados foram representados como os valores das médias dos grupos na diluição 1:960 na absorbância a 492nm. As flechas indicam as vacinações nos dias 7 e 28, respectivamente. A análise estatística foi realizada pelo teste two-way ANOVA seguido de teste de Tukey. Os asteriscos significam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais nos dias 7, 21 e 35 do experimento..... 47
- Figura 3 Transcrição de mRNA das citocinas IL-4, IL-17 e IFN- γ em PBMCs caninas. As células foram estimuladas *in vitro* com esporos, DNA e células vegetativas de *B. toyonensis*. O RNA total foi extraído e o cDNA submetido ao qPCR. A transcrição relativa dos genes IL-4, IL-17 e IFN- γ foi calculada a partir dos valores do Threshold Cycle (Ct), através da comparação com a transcrição do gene endógeno GAPDH de referência..... 48

Lista de Tabelas

Artigo 1

Tabela 1	Estudos sobre probióticos em cães e seus efeitos.....	30
----------	-------------------------------------------------------	----

Artigo 2

Tabela 1	Sequência de oligoiniciadores utilizados para a amplificação do gene das citocinas.....	45
----------	-----------------------------------------------------------------------------------------	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

BoHV-5	Bovine herpesvirus type 5
CD	Cluster of differentiation
DCs	Dendritic cells
ConA	Concanavalina A
CPV	Canine parvovirus type 2
DNA	Deoxyribonucleic acid
DII	Doença inflamatória intestinal idiopática
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EPP	Enteropatia com perda de proteína
FAO	Food and Agriculture Organization
IFN- γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	Messenger RNA
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PBS-T	Phosphate buffered saline with 0,05% of Tween-20
PRRs	Pattern recognition receptors
RNA	Ribonucleic acid
RPM	Rotação por minuto
Th	T helper
TGF- β	Transforming growth factor beta.
TNF- α	Tumor necrosis fator alpha

UFC	Unidade formadora de colônia
UHA	Unidades hemaglutinantes
WHO	World Health Organization
v/v	Volume/volume

Lista de Símbolos

<	Menor
>	Maior
®	Marca registrada
A	Alfa
B	Beta
Γ	Gama
°C	Grau Celsius
μg	Micrograma
μL	Microlitro

Sumário

1 Introdução.....	13
2 Objetivos.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 Artigos.....	16
3.1 Artigo 1.....	16
3.2 Artigo 2.....	37
4 Considerações Finais.....	58
Referências.....	59
Anexo.....	67

1 Introdução

A primeira espécie animal domesticada foi a canina e, junto dos felinos, o cão tornou-se um dos animais de companhia mais populares ao redor do mundo (STROMPFOVÁ et al., 2017). A convivência com animais de estimação é uma parte estável da vida humana e, portanto, há o aumento do interesse em promover o bem-estar e a saúde destes animais nas últimas décadas (GRZESKOWIAK et al., 2015). Neste sentido, a utilização de probióticos pode contribuir trazendo benefícios à saúde dos cães, pois seus mecanismos de ação incluem fatores que aprimoram as defesas naturais do organismo, como: alteração e fortalecimento da microbiota intestinal, produção de compostos com atividades antimicrobianas, inibição da adesão de microrganismos patogênicos e modulação da resposta imune (THOMAS; VERSALOVIC, 2010).

Probióticos podem ser definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, promovem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Estimulação da produção de imunoglobulinas, indução do aumento da atividade de macrófagos e linfócitos, influência na produção de citocinas são alguns mecanismos de atuação dos probióticos modulando as respostas imunológicas (PELUSO et al., 2007; OELSCHLAEGGER, 2010; WYNN, 2009). No entanto, estes efeitos dependem do microrganismo probiótico que será utilizado (OELSCHLAEGGER, 2010). No ambiente intestinal, os probióticos modulam a resposta imune inata e adaptativa atuando junto às células epiteliais intestinais e células dendríticas, que estão aptas a reconhecer os microrganismos probióticos através de seus receptores de reconhecimento padrão (PRRs), especialmente os receptores *toll-like* (TLRs) (GÓMEZ-LLORENTE et al., 2010). A resposta depende do subtipo de células que são ativadas: as células de Paneth produzem defensinas e as caliciformes potencializam a produção de muco, as células dendríticas ativadas intensificam a síntese de citocinas, moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e moléculas co-estimulatórias capazes de polarizar as respostas dos linfócitos T auxiliares em Th1, Th2, Treg e Th17 (LEBEER et al., 2010).

Bacillus toyonensis trata-se de uma bactéria Gram-positiva formadora de esporos, não patogênica, que há décadas é utilizada na nutrição animal em vários países ao redor do mundo (JIMÉNEZ et al., 2013). A princípio, este microrganismo foi identificado como sendo uma cepa da espécie *B. cereus* (*B. cereus* var. *toyoi*), porém estudos posteriores reconheceram, através de comparação de sequências do genoma e do perfil fenotípico, que se tratava de uma nova espécie, a qual então foi denominada *B. toyonensis* (JIMÉNEZ et al., 2013). A sua inicial utilização data de 1975, quando a preparação comercial TOYOCERIN® foi oficialmente aprovada no Ministério da Agricultura e Florestas do Japão. Já na comunidade Européia, sua autorização ocorreu em 1994, inicialmente para a espécie suína, tornando-se o microrganismo pioneiro autorizado como aditivo alimentar. No decorrer do tempo veio também a permissão para a utilização em aves, bovinos e coelhos (WILLIAMS et al., 2009).

Estudos que utilizaram *B. toyonensis* como probiótico para a suplementação de camundongos e ovinos obtiveram resultados promissores relacionados ao seu efeito imunomodulador e à capacidade de aumentar a eficácia de vacinas. A suplementação de camundongos estimulou uma maior soroconversão contra o parvovírus canino (COPPOLA et al., 2005). Também se verificou em um estudo mais recente, a ocorrência de maiores níveis de imunoglobulinas totais no soro e elevação dos níveis de transcrição de interleucinas 4 (IL-4) e 12 (IL-12) dos esplenócitos desta espécie, quando vacinada contra herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) (SANTOS et al., 2018). Para ovinos, os efeitos foram similares, resultando em aumento na soroconversão e maiores títulos de anticorpos neutralizantes contra BoHV-5 (ROOS et al., 2018).

Pesquisas relacionadas à probióticos com caninos, em que foi avaliado o efeito na resposta imune, envolveram *Enterococcus faecium*, microrganismos do gênero *Lactobacillus* e as Bifidobactérias (BAILLON et al., 2004; BENYACOUB et al., 2003; ROSSI et al., 2014), porém não há relatos conhecidos por este autor da utilização de *B. toyonensis* para esta espécie animal. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito imunomodulador da suplementação com *B. toyonensis* para cães que foram vacinados contra parvovirose.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos do probiótico *B. toyonensis* na imunomodulação de cães.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a modulação da resposta imune humoral (níveis de IgG total) de cães vacinados contra parvovirose conforme esquema de vacinação adotado no canil e suplementados com *B. toyonensis*.
- Avaliar a modulação da resposta imune celular (transcrição de mRNA das citocinas IL-4, IL-17, IFN- γ) em PBMCs de cães quando estimuladas com células vegetativas, DNA e esporos do *B. toyonensis*.
- Realizar os hemogramas seriados dos cães vacinados e suplementados com *B. toyonensis*.

3 Artigos

3.1 Artigo 1

Probióticos em cães

Helen Cabaldi Franz, Francisco Denis Souza Santos, Vitória Sequeira Gonçalves,
Maria Eduarda Bicca Dode, Silvia de Oliveira Hübner e Fábio Pereira Leivas Leite

Submetido à revista Ciência Rural

Probióticos em cães**Probiotics in dogs****-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-****RESUMO**

Após mais de um século das primeiras observações de Élie Metchnikoff sobre certas bactérias responsáveis por efeitos benéficos à saúde, temos a popularização dos probióticos. Há uma indústria crescente ao redor destes microrganismos, tanto em produtos para uso humano, quanto animal. Probióticos são definidos como microrganismos viáveis que quando administrados em quantidades adequadas promovem benefícios à saúde do hospedeiro. Na medicina de caninos, os probióticos demonstram benefícios com potencial na modulação do sistema imune e na prevenção e tratamento de doenças, principalmente gastrointestinais. Neste artigo, revisamos conhecimentos das funções e aplicações dos probióticos para a espécie canina, incluindo novas áreas para pesquisas.

Palavras-chave: caninos, bactérias, microrganismos.

ABSTRACT

After more than a century of the first observations of Élie Metchnikoff on certain bacteria responsible for beneficial effects to health, we have the popularization of probiotics. There is a growing industry around these microorganisms, both in products for human use, as well as animal. Probiotics are defined as viable microorganisms that when ingested in appropriate quantities promote health benefits to the host in dog medicine, probiotics demonstrate potential benefits in modulating the immune system and in preventing and

treating diseases, especially gastrointestinal diseases. In this paper, we review current knowledge of the functions and applications of probiotics for canine species, including new areas for research.

Key words: canines, bacteria, microorganisms.

INTRODUÇÃO

Variadas definições para o termo probiótico foram estabelecidas no decorrer do tempo de sua utilização. Atualmente o conceito reconhecido internacionalmente é o estabelecido pela Organização Mundial da Saúde e Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (2002), que descrevem probióticos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, promovem benefícios à saúde do hospedeiro. Porém, existem exigências a serem cumpridas para que um microrganismo possa ser considerado como probiótico. Conforme a FAO e a OMS (2002), é preciso avaliar sua identidade (gênero, espécie e local de onde foi isolado), realizar testes *in vitro* que apresentem a resistência do microrganismo frente à acidez gástrica, aos ácidos biliares e às enzimas digestivas, investigar sua atividade contra microrganismos patogênicos, avaliar a segurança na sua administração e proceder com estudos *in vivo* que comprovem efeitos benéficos na saúde do hospedeiro.

O efeito probiótico de certos microrganismos já foi comprovado, destacando os gêneros bacterianos *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Bifidobacterium* e, as leveduras *Saccharomyces boulardii* e *S. cerevisiae* amplamente empregados em medicina humana (BUTS & KEYSER, 2006; MARTINS et al., 2010). Na medicina animal, também os microrganismos não ácido-láticos e formadores de esporos, como o *B. toyonensis*, possuem características favoráveis a sua utilização, que incluem a estocagem sem ser necessária a refrigeração e a capacidade de

sobrevivência no trato gastrointestinal (CUTTING, 2011). Com relação aos mecanismos de ação dos probióticos, há a inclusão de fatores que aprimoram as defesas naturais do organismo, como: alteração e fortalecimento da microbiota intestinal, produção de compostos com atividades antimicrobianas, inibição da adesão de microrganismos patogênicos e modulação da resposta imune (THOMAS & VERSALOVIC, 2010). Na medicina de cães e gatos, assim como para animais de produção, os probióticos demonstram benefícios em potencial na modulação do sistema imune e na prevenção e tratamento de doenças, principalmente gastrointestinais (WYNN, 2009).

Neste artigo, revisamos conhecimentos das funções e aplicações dos probióticos para a espécie canina, incluindo novas áreas para pesquisas.

Definição e breve histórico

Em 1905, Élie Metchnikoff, cientista e imunologista russo, colaborador do Instituto Pasteur em Paris e premiado com o Prêmio Nobel de Medicina por seu trabalho em imunologia em 1907, propôs que certas bactérias produtoras de ácido láctico presentes no leite fermentado eram capazes de ocasionar mudanças benéficas na saúde humana. Metchnikoff recomendava a ingestão diária de uma formulação de um iogurte que era composto por um grupo de bactérias lácticas ou de culturas puras do bacilo búlgaro (*L. bulgaricus*), as quais seriam responsáveis por abolir bactérias putrefativas do cólon (MACKOWIAK, 2013). Posterior pesquisa revelou que *L. bulgaricus* não tem a capacidade de sobreviver ao ambiente intestinal e, devido a isso, não seria possível a atuação em detrimento das bactérias putrefativas do cólon (KULP & RETTGER, 1924).

A partir das observações de Metchnikoff, muitos outros ensaios com inúmeros microrganismos foram estabelecidos. No ano de 1954, o cientista alemão Ferdinand Vergin estudou os efeitos nocivos dos antibióticos e outros agentes antimicrobianos na microbiota intestinal em comparação aos benefícios provocados por algumas bactérias, gerando o artigo

intitulado "Anti-und Probiotika", sendo considerado o possível inventor do termo probiótico. Em 1965, Lilly e Stillwell caracterizaram os probióticos como sendo microrganismos que eram responsáveis por causar o crescimento de outros ou produzir substâncias que promoviam um efeito benéfico no equilíbrio microbiano intestinal. Mais de 20 anos depois, foi estabelecido que probióticos fossem suplementos alimentares com base de microrganismos viáveis, que precisariam exercer um efeito benéfico ao hospedeiro (FULLER, 1989). Em contra partida, estudos mais recentes sugerem a necessidade de uma dose apropriada dos organismos probióticos para que estes efeitos almejados possam ser expressos no organismo (MINELLI & BENINI, 2008). Portanto, a definição atual, sustentada desde 2013 pela Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos e, atualmente reconhecida internacionalmente, é a de que probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas promovem benefícios à saúde do hospedeiro (HILL et al., 2014).

Escherichia coli não patogênica Nissle 1917 foi um dos microrganismos pioneiros como probiótico e vem sendo ainda utilizado. As bactérias mais empregadas como probióticos incluem as da espécie *Lactobacillus* e as Bifidobactérias. A levedura probiótica mais comumente utilizada é o *Saccharomyces boulardii* (BALAKRISHNAN & FLOCH, 2012). De fato, os probióticos tornaram-se bastante populares. Presenciamos o cenário de uma indústria crescente ao redor da comercialização de probióticos, seja nos alimentos, nos diversos formatos farmacêuticos ou como suplementos dietéticos, tanto para uso humano, como animal (SANDERS, 2003).

Em animais de produção, os probióticos vêm sendo utilizados há muito tempo como uma alternativa aos antibióticos, como promotores de crescimento (FULLER, 1989). O uso de probióticos em animais de estimação é mais recente, provavelmente devido ao fato da conscientização das pessoas de que produtos similares aos que eram utilizados por elas,

puddessem ser administrados para os animais de companhia para também se obter os efeitos benéficos (HAMLIN, 2011).

Particularidades dos microrganismos probióticos

Primordialmente, o microrganismo probiótico deve possuir um histórico de não ser patogênico e ter sua segurança garantida ao consumo, bem como não apresentar genes que compõem a característica de resistência aos antibióticos de uso clínico (PEREIRA et al., 2018). Além destes, é possível destacar os aspectos funcionais e fisiológicos, os quais definirão a sobrevivência do microrganismo frente ao trato gastrointestinal, como a resistência frente ao meio ácido e à ação dos sais biliares, e a capacidade de aderir e colonizar o intestino. A avaliação destas propriedades é possível de ser alcançada pela simulação do ambiente no qual o microrganismo será inserido, através de testes *in vitro* (SAAD, 2006).

Não menos importantes são as propriedades utilizadas no processo de produção e nas etapas de armazenamento e distribuição, pois garantem a viabilidade do produto e que não existam alterações de suas características (PEREIRA et al., 2018). Neste sentido, vale destacar os microrganismos que apresentam facilidade no crescimento e que são aplicáveis para a produção em larga escala (SAAD, 2006). Na alimentação animal, os microrganismos não ácido-láticos, como *S. boulardii* e *Bacillus toyonensis*, possuem características favoráveis a sua utilização. *B. toyonensis* é uma bactéria Gram-positiva formadora de esporos, não patogênica, que há décadas é utilizada na nutrição animal, promovendo a melhora na eficiência alimentar e na saúde de suínos, aves, bovinos, coelhos, bem como na aquacultura em muitos países (JIMÉNEZ et al., 2013). *Saccharomyces boulardii* é uma levedura não patogênica, termotolerante, que exerce benefícios à saúde do hospedeiro, sendo usada amplamente na prevenção e tratamento de desordens gastrointestinais agudas e crônicas de humanos. Na medicina veterinária é utilizada notadamente para animais de produção e equinos (BRESCIANI et al., 2014). Muitas empresas do ramo pet já oferecem alimentos que

apresentam culturas probióticas em sua composição (HAMLIN, 2011). *Lactobacillus acidophilus* foi testado quanto a viabilidade no processo de produção de uma ração para cães, indicando que esta bactéria foi capaz de sobreviver ao processo de produção e estocagem do alimento (BAILLON et al., 2004). Existe também a atenção quanto à palatabilidade e a praticidade em administração aos animais de estimação, sendo que pode ser vantajoso o suplemento que pode ser adicionado a qualquer tipo de alimento ou até mesmo diretamente para o animal, como alimento mastigável (HAMLIN, 2011).

Outros aspectos relevantes são a dose e o tempo de administração necessário para que o probiótico exerça seus benefícios no organismo do hospedeiro. OUWEHAND (2017) ressalta em sua revisão sobre respostas de doses para humanos, que existe uma influência de variáveis que impossibilitam a indicação de uma melhor concentração para resultados benéficos. Segundo o autor, estas variáveis incluem finalidade, espécie de microrganismo probiótico, veículo de entrega e administração. MINELLI & BENINI (2008) mencionam que a maioria dos estudos, principalmente aqueles que utilizam probióticos para tratamento de distúrbios do trato gastro intestinal, indicam que os efeitos dependem da dosagem e citam de 10^7 a 10^9 UFC/g diariamente para humanos. SANTOS et al. (2018) observaram que a suplementação de camundongos com *B. toyonensis* (10^8 UFC/g) por sete dias já promoveu efeitos benéficos na imunidade dos animais. Nosso grupo de pesquisa vem realizando ensaios que apontam qual o tempo necessário de suplementação que seria capaz de promover efeitos benéficos na saúde de diversas espécies animais. No entanto, a definição de probióticos aceita internacionalmente não deixa claro qual a concentração de microrganismos e quantos dias são necessários para que se alcancem os benefícios para o hospedeiro (HILL et al., 2014).

Mecanismos de ação dos probióticos na microbiota intestinal

O equilíbrio da microbiota intestinal estabelece papel fundamental para a manutenção da saúde (HONDA & LITTMAN, 2012). Ainda neste sentido, é possível dizer que a

microbiota intestinal residente é capaz de causar, contribuir e modular a saúde, assim como a doença, podendo também ser responsável por implicar variáveis distúrbios ao organismo (GRICE & SEGRE, 2011). A constatação de que existem distinções no perfil da composição da microbiota dos organismos saudáveis e doentes conduziu a uma ideia de que manipular essas comunidades microbianas pode ser vantajoso para a promoção da saúde, chamando a atenção para a utilização dos probióticos neste sentido (SCHMITZ & SUCHODOLSKI, 2016), especialmente para a resolução de doenças intestinais caninas (ROSSI et al., 2014; HERSTAD et al., 2010).

A presença dos probióticos resulta na competição por sítios de ligação e na disputa por nutrientes, fatos que os tornam importantes para manter a microbiota intestinal equilibrada. A característica que os microrganismos probióticos possuem de ocupar sítios de ligação no intestino e formar uma barreira protetora também é fundamental para evitar a colonização por bactérias patogênicas (SCHACHTSIEK, 2004; LAVERMICOCCA et al., 2005).

As bactérias presentes no lúmen intestinal têm sua nutrição baseada em substâncias que foram parcialmente digeridas por enzimas ou que foram intencionalmente acrescentadas à dieta como prebióticos (GIBSON et al., 2005). Prebióticos referem-se a elementos alimentares não digeríveis que fomentam seletivamente o desenvolvimento ou ação de populações de bactérias desejáveis no cólon, ocasionando vantagens ao hospedeiro (SAAD, 2006). As bactérias probióticas e patogênicas disputam e, a escassez dos nutrientes disponíveis no ambiente intestinal, torna-se um limitante para as bactérias patogênicas (GIBSON et al., 2005).

Os microrganismos probióticos tem a capacidade de produzir e liberar moléculas, tais como as bacteriocinas e os ácidos orgânicos, que agem sobre as bactérias patogênicas promovendo uma ação bacteriostática ou bactericida (VÉLEZ et al., 2007). Bacteriocinas são caracterizados por serem peptídeos heterogêneos pequenos, resistentes ao calor e que atuam

formando um complexo com os componentes da membrana da bactéria alvo, geralmente levando a formação de poros e um efeito detergente (BIERBAUM & SAHL, 2009). Os ácidos orgânicos, especialmente o ácido acético e o ácido láctico, apresentam uma potente inibição contra bactérias Gram-negativas, sendo conhecidos como as principais substâncias antimicrobianas produzidas por probióticos que agem causando dano às bactérias patogênicas (MAKRAS et al., 2006). Os ácidos orgânicos na forma não dissociada penetram na célula bacteriana através da sua membrana, dissociando-se no citoplasma e causando uma redução de pH intracelular ou acumulando no seu interior de forma ionizada. Esta desestabilização do patógeno acaba resultando em morte (RUSSELL & DIEZ-GONZALES, 1998).

Mecanismos de ação imunomoduladores dos probióticos

Há evidências de que probióticos modulam a resposta imune através da estimulação da produção de imunoglobulinas, indução do aumento da atividade de macrófagos e linfócitos, bem como pelo estímulo da produção de citocinas (PELUSO et al., 2007; OELSCHLAEGER, 2010; WYNN, 2009). Os efeitos dos probióticos na modulação da resposta imune dependem do microrganismo utilizado (OELSCHLAEGER, 2010). No intestino, os probióticos interagem com as células epiteliais intestinais e com as células dendríticas (DCs), estimulando a resposta imune inata e adaptativa. Estas células tem a habilidade de reconhecer os probióticos através de seus receptores de reconhecimento padrão (PRRs), principalmente os receptores *toll-like* (GÓMEZ-LLORENTE et al., 2010) e a resposta gerada está ligada ao subtipo de células que são ativadas. As células de Paneth ativadas são produtoras de defensinas e as do tipo caliciformes intensificam a produção de muco. As DCs quando estimuladas com os probióticos reagem com maior síntese de citocinas, moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e moléculas co-estimulatórias capazes de polarizar as respostas dos linfócitos T auxiliares em Th1, Th2, Treg e Th17 (LEBEER et al., 2010). Os gêneros *Lactobacillus* e o *Bifidobacterium* estimulam células mononucleares do

sangue periférico (PBMCs) de humanos a produzirem citocinas, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interferon-gama (IFN- γ), interleucina 10 (IL-10) e (fator de transformação do crescimento beta) TGF- β que induzem a propagação de respostas imunes diferenciadas (SOLIMAN et al., 2015). No entanto, ainda não existe um esclarecimento de fato dos mecanismos de atuação dos probióticos.

Diversos ensaios nas variadas espécies adotam combinações de probióticos para o alcance dos efeitos imunomoduladores. SAUTER (2005) observou que as cepas probióticas de *L. acidophilus* NCC2628 e NCC2766 e *L. johnsonii* NCC2767 não induziram aumento nas concentrações das citocinas regulatórias e pró-inflamatórias quando testadas individualmente. Porém, quando houve uma combinação das três cepas houve alterações significativas nas proporções das citocinas em ensaios realizados *ex vivo* em cultivos celulares de biópsias de cães, sugerindo um sinergismo entre as bactérias.

A suplementação com determinados probióticos pode ser considerada uma alternativa para aumentar a eficiência de vacinas através da modulação da resposta imune (ROOS et al., 2012). Camundongos vacinados com uma vacina replicante contra parvovírus canino e com uma bacterina de *E. coli*, quando suplementados com os microrganismos *B. toyonensis* e *S. boulardii*, tiveram uma significativa soroconversão nos animais suplementados em relação aos controles. *Saccharomyces boulardii* levou a um aumento na soroconversão para a bacterina e *B. toyonensis* estimulou uma maior soroconversão contra o parvovírus canino (COPPOLA et al., 2005). A suplementação com *B. toyonensis* foi capaz de modular a resposta imune de camundongos e ovinos vacinados contra herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) (ROOS et al., 2018; SANTOS et al., 2018), sendo observado um aumento nos níveis de imunoglobulinas totais no soro em comparação ao grupo controle. Os esplenócitos dos camundongos suplementados apresentaram maiores níveis de transcrição de interleucinas 4 (IL-4) e 12 (IL-12) (SANTOS et al., 2018).

Por se tratar de uma área de grande interesse, as pesquisas são numerosas e algumas questões vêm sendo elucidadas em relação ao modo de atuação dos probióticos no sistema imunológico. Porém, ainda é preciso muitos ensaios para se estudar o efeito específico de cada microrganismo probiótico, primordialmente com testes *in vitro*, posterior em modelos animais e por fim, através das intervenções nas diversas espécies animais.

Probióticos em cães

Bactérias ácido-lácticas, bactérias não ácido lácticas e leveduras têm sido utilizadas como probióticos em estudos com cães, em concentrações geralmente acima de 10^8 UFC/dia (Tabela 1). Algumas destas pesquisas relatam a recuperação nas fezes dos probióticos administrados (MARCINÁKOVÁ et al., 2006; BAILLON et al., 2004; STROMPFOVA et al., 2012; BRESCIANI et al., 2014). A recuperação dos microrganismos nas fezes corrobora a sobrevivência destes pelo ambiente desfavorável do trato gastrointestinal e a provável colonização do intestino dos animais, indicando que a administração dessa concentração mínima por dia pressupõe-se adequada para esta espécie.

Um fator importante abordado em alguns destes estudos é a detecção da diminuição de bactérias patogênicas nas fezes durante o período em que os cães estão recebendo os probióticos (MARCINÁKOVÁ et al., 2006; BAILLON et al., 2004; STROMPFOVA et al., 2012; MAHONY et al., 2009), constatação que indica um eficiente mecanismo de disputa na microbiota intestinal canina. BAILLON (2004), estudando o efeito de *Lactobacillus acidophilus* fornecido junto a uma dieta seca para cães saudáveis adultos, detectou um aumento nos números de lactobacilos nas fezes durante o período de administração do probiótico, e diminuição do número de *Clostridium* sp. fecais. Também cães que receberam *B. animalis* na dieta durante seis semanas, apresentaram redução na contagem de *Clostridium difficile* nas fezes (MAHONY et al., 2009).

Faz-se importante ressaltar que grande parte dos estudos com probióticos *in vivo* em cães tiveram como foco o tratamento de animais com distúrbios gastrointestinais e foram realizados de maneira não controlada (SCHMITZ et al., 2013). Estes estudos referem-se à atuação dos probióticos em microbiotas desequilibradas, com composições de diversos microrganismos, enfatizando apenas a recuperação dos cães e não tendo como foco a descoberta dos mecanismos de atuação dos probióticos. Para o alcance deste conhecimento se faz necessário abordagens experimentais que apresentem uma padronização de cães que apresentem microbiotas similares e saudáveis.

Em cães que apresentavam doença inflamatória intestinal, uma combinação de probióticos (*Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus*, *Bifidobacterium longum*, *B. breve* e *B. infantis*) restaurou a expressão dos componentes de junção da barreira intestinal (claudin-2, occludin e proteínas de junção de aderência) (ROSSI et al., 2014). Em cães acometidos por gastroenterite aguda, onde também foi administrado um composto de probióticos (*Lactobacillus acidophilus*, *L. farciminis*, *Pediococcus acidilactici*, *Bacillus subtilis*, e *B. licheniformis*), houve redução dos dias necessários para a produção de fezes normais em comparação com os animais do grupo controle (HERSTAD et al., 2010). Cães acometidos por diarreia aguda idiopática ao serem suplementados com *B. animalis* diminuem o tempo de resolução do distúrbio (KELLEY et al., 2009). Em um trabalho realizado num centro de resgate animal, não houve efeito profilático de diarreias em cães suplementados com o probiótico *E. faecium*, embora a suplementação em gatos tenha se mostrado estatisticamente eficaz (BYBEE et al., 2011).

Em relação à atuação no sistema imune, Sauter e colaboradores (2006) administraram uma combinação de probióticos (*L. acidophilus* NCC2628 e NCC2766 e *L. johnsonii* NCC2767) juntamente a uma dieta de eliminação (dieta baseada em novas fontes de proteínas) para cães com diarreia responsiva a sensibilidade alimentar e observaram

incremento na produção de IFN- γ no cólon (SAUTER et al., 2006). Em testes realizados *ex vivo*, houve aumento dos níveis de interleucina 10 (SAUTER et al., 2005). Em outro estudo, cães que receberam a suplementação com *E. faecium* (SF68) desde o desmame até um ano de idade, apresentaram um aumento de IgG nas fezes e IgA circulantes específicas contra o vírus da cinomose canina, sem diferenças nas proporções de linfócitos T CD4+ e CD8+ periféricos. A quantidade de linfócitos B maduros CD21+ e MHC classe II + foi maior nos cães suplementados com o probiótico (BENYACOUB et al., 2003). No sangue periférico é descrito aumento de hemácias, hematócrito, concentração de hemoglobina, neutrófilos e monócitos e, o incremento de IgG total no soro em cães que recebem *L. acidophilus* (BAILLON, 2004).

Diversos estudos, estabelecidos em humanos possibilitaram a detecção de benefícios adicionais dos probióticos, como prevenção de infecções recorrentes do trato urinário, prevenção e tratamento de alergias, tratamento de pancreatites e urolitíases por oxalato, entre outros (WYNN, 2009). Portanto, é preciso ampliar as pesquisas para caninos com o objetivo de verificar se estes benefícios também podem ser observados nesta espécie.

CONCLUSÃO

Apesar de vários probióticos já serem amplamente administrados para animais de companhia com o objetivo de restabelecimento do equilíbrio intestinal, poucas pesquisas foram realizadas para esclarecer os mecanismos de atuação e como se dá a interação com a microbiota intestinal dos cães. Muitos estudos sobre probióticos em caninos foram realizados com animais que apresentavam distúrbios intestinais, sendo procedidas observações clínicas. É necessária a realização de experimentos com animais saudáveis, de forma controlada, para que além da observação do quadro clínico, possam ser analisados parâmetros que possam elucidar os benefícios dos probióticos para esta espécie e seus mecanismos de atuação. Além disso,

outros benefícios já foram averiguados em humanos, o que indica que ainda há uma série de efeitos possíveis para serem investigados nesta espécie.

DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS

We have no conflict of interest to declare.

Tabela 1 – Estudos sobre probióticos em cães e seus efeitos

Composição probiótica	Cães	Efeitos	Referência
<i>E. faecium</i> (SF68) 5x10 ⁸ UFC/dia	Filhotes saudáveis	Aumento de IgA fecal e IgG e IgA circulantes específicos para cinomose canina	BENYACOUB et al., 2003
<i>E. faecium</i> (EE3) 10 ⁹ UFC/mL/5kg	Adultos saudáveis	Aumento de bactérias ácido lácticas e diminuição de <i>Pseudomonas</i> e <i>Staphylococcus</i> spp. nas fezes. Diminuição de lipídios séricos totais.	MARCINÁKOVÁ et al., 2006
<i>L. acidophilus</i> (DSM13241) 10 ⁹ UFC/dia	Adultos saudáveis	Aumento de lactobacilos fecais e diminuição de clostridiais. Aumentos de hemácias, hematócrito, hemoglobina, neutrófilos, monócitos e IgG sérico.	BAILLON et al., 2004
<i>L. fermentum</i> (AD1) 2x10 ⁸ UFC/dia	Adultos saudáveis	Aumento de lactobacilos fecais e diminuição de clostridiais e bactérias Gram-negativas (coliformes, <i>Aeromonas</i> , <i>Pseudomonas</i>)	STROMPFOVA et al., 2012
<i>B. animalis</i> (AHC7) 1.5x10 ⁹ UFC/dia	Adultos saudáveis	Redução de <i>C. difficile</i> nas fezes	MAHONY et al., 2009
<i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> spp bulgaricus, <i>B. longum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> spp thermophilus 450x10 ⁹ UFC/dia	Filhotes parvovirose	Maior taxa de sobrevivência e, mais rápida melhora clínica e na contagem de leucócitos/linfócitos.	ARSLAN et al., 2012
<i>B. animalis</i> (AHC7) 2x10 ¹⁰ UFC/dia	Adultos diarreia idiopática aguda	Diminuição do tempo de resolução do quadro clínico	KELLEY et al., 2009
<i>L. acidophilus</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>L. farciminis</i> 10 ⁹ UFC/mL/10kg, 3x/dia	Adultos gastroenterite aguda	Diminuição do tempo para a resolução do quadro clínico	HERSTAD et al., 2010
<i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. bulgaricus, <i>B. longum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>S. sulivarius</i> spp thermophilus 112 a 225x10 ⁹ UFC/10kg/dia	Adultos doença inflamatória intestinal idiopática (DIII)	Aumento de células FoxP3+ (marcador de linfócitos T auxiliares reguladores); aumento de <i>Faecalibacterium</i> (bactéria comensal antiinflamatória e de menor abundância em conteúdo intestinal ou amostras fecais de cães com DIII).	ROSSI et al., 2014
<i>S. boulardii</i> 1x10 ⁹ UFC/kg, 2x/dia	Adultos doença inflamatória intestinal e enteropatia com perda de proteína (EPP)	Diminuição do tempo de resolução do quadro clínico; nos EPP a concentração de albumina aumentou significativamente.	BRESCIANI et al., 2014

REFERÊNCIAS

ARSLAN, H.H. et al. Therapeutic effects of probiotic bacteria in parvoviral enteritis in dogs.

Revue De Medecine Veterinaire, v.163, p.55-59, 2012.

BAILLON, M.L.A. et al. Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* strain DSM13241 in healthy adult dogs. **American Journal of Veterinary**, v.65, n.3, p.338-343, 2004.

BALAKRISHNAN, M.; FLOCH, M.H. Prebiotics, probiotics and digestive health. **Current Opinion Clinical Nutrition Metabolic Care**, v.15, n.6, p.580-585, 2012.

BENYACOUB, J. et al. Supplementation of Food with *Enterococcus faecium* (SF68) Stimulates Immune Functions in Young Dogs. **The Journal of Nutrition**, v.133, p.1158-1162, 2003.

BIERBAUM, G.; SAHL, H.G. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.10, p.2-18, 2009.

BRESCIANI, F.; MARCO P. Efficacy of *Saccharomyces boulardii* in the treatment of dogs with chronic enteropathies - randomized double-blind placebo-controlled study. European College of Veterinary Internal Medicine - **Companion Animals Congress Proceedings**, 2014.

BUTS, J.P.; KEYSER, N.D. Effects of *Saccharomyces boulardii* on Intestinal Mucosa. **Digestive Disease and Sciences**, p.1485-1492, 2006.

BYBEE, S.N. et al. Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* SF68 on presence of diarrhea in cats and dogs housed in an animal shelter. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.25, p.856-860, 2011.

COPPOLA, M.M. et al. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. Toyoi on the humoral and cellular response of mice to vaccines. **Food and Agricultural Immunology**, Basingstoke, v.16, n.3, p.213-219, 2005.

CUTTING, S.M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**, v.28, p.214-220, 2011.

GIBSON, G.R. et al. Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections. **British Journal of Nutrition**, London, v.93, n.1, p.31-34, 2005.

GÓMEZ-LLORENTE, C. et al. Role of Toll-like receptors in the development of immunotolerance mediated by probiotic. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.69, p.381-389, 2010.

GRICE, E.A.; SEGRE, J.A. The skin microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v.9, p.244-253, 2011.

HAMLIN, J. The use of probiotics as dietary supplements in dogs. **The Veterinary Nurse**, v.2, n.2, p.82-87, 2011.

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

HERSTAD, H.K. et al. Effects of a probiotic intervention in acute canine gastroenteritis – a controlled clinical trial. **Journal of Small Animal Practice**, v.51, p.34-38, 2010.

HILL, C. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews. Gastroenterology Hepatology**, v.11, p.506-514.

doi:10.1038/nrgastro. 2014.

HONDA, K.; LITTMAN, D.R. The microbiome in infectious disease and inflammation. **Annual Review Immunology**, v.30, p.759-95, 2012.

JIMÉNEZ, G. et al. Description of *Bacillus toyonensis* s.p nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. **Systematic and Applied Microbiology**, v.36, p.383-391, 2013.

KELLEY, R.L. et al. Clinical benefits of probiotic canine-derived *Bifidobacterium animalis* strain HC7 in dogs with acute idiopathic diarrhea. **Veterinary Therapeutics**, v.10, p.121-130, 2009.

- KULP, W.L.; RETTGER, L.F. Comparative Study of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Bacteriology**. v.9, n.4, p.357-95, 1924.
- LAVERMICOCCA, P. et al. Study of adhesion and survival of Lactobacilli and Bifidobacteria on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, n.8, p.4233-4240, 2005.
- LEBEER, S. et al. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. **Nature Review Microbiology**, v.8, p.171-184, 2010.
- LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v.147, p.747-748. doi: 10.1126/science.147.3659.747. 1965.
- MACKOWIAK, P.A. Recycling Metchnikoff: probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. **Frontiers in public health**, v.1, p.1-3, 2013.
- MAHONY, D.O. et al., Portrait of a canine probiotic *Bifidobacterium* - from gut to gut. **Veterinary microbiology**, v.139, p.106-112, 2009.
- MAKRAS, L. et al. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. **Research in Microbiology**, v.157, p.241-247, 2006.
- MARCINÁKOVÁ, M. et al. Oral application of *Enterococcus faecium* strain EE3 in healthy dogs. **Folia Microbiologica**, v.51, p.239-242, 2006.
- MARTINS, A.K.S. et al. Evaluation of in vitro antagonism and of in vivo immune modulation and protection against pathogenic experimental challenge of two probiotic strains of *Bifidobacterium animalis* var. lactis. **Archives of Microbiology**, v.192, p.995-1003, 2010.
- MINELLI E.B.; BENINI A. Relationship between number of bacteria and their probiotic effects. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.20, p.180-183, 2008.
- OELSCHLAEGER T.A. Mechanisms of probiotic actions—A review. **International Journal Medical Microbiology**, v.300, p.57-62. doi: 10.1016/j.ijmm.2009.08.005. 2010.

- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. London, Ontario, Canada. 11p. April 30 and May 1, 2002.
- OUWEHAND A.C. A review of dose-responses of probiotics in human studies. **Beneficial Microbes**, v.8, p.143-151, 2017.
- PELUSO, I. et al. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* B21060 suppresses human T-cell proliferation. **Infection and immunity**, Washington, v.75, n.4, p.1730-1737, 2007.
- PEREIRA, G.V.M. et al. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. **Biotechnology Advances**, v.36, n.8, p.2060-2076, 2018.
- ROOS, T.B. et al. The immune modulation of *Bacillus cereus* var. Toyoi in mice immunized with experimental inactivated Bovine Herpesvirus Type 5 vaccine. **Vaccine**, v.30, p.2173-2177, 2012.
- ROOS T.B. et al. Probiotics *Bacillus toyonensis* and *Saccharomyces boulardii* improve the vaccine immune response to Bovine herpesvirus type 5 in sheep. **Research in Veterinary Science**, v.117, p.260-265, 2018.
- ROSSI, G. et al. Comparison of Microbiological, Histological, and Immunomodulatory Parameters in Response to Treatment with Either Combination Therapy with Prednisone and Metronidazole or Probiotic VSL#3 Strains in Dogs with Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. **PLOS ONE**, v.9, n.4, doi:10.1371/journal.pone.0094699. 2014.
- RUSSELL, J.B.; DIEZ-GONZALEZ, F. The effects of fermentation acids on bacterial growth. **Advances Microbial Physiology**, v.39, p.205-234, 1998.
- SAAD, S. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**; v.42, n.1, 2006.
- SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, v.61, p. 91-99, 2003.

- SANTOS, F. D. S. et al. *Bacillus toyonensis* improves immune response in the mice vaccinated with recombinant antigen of bovine herpesvirus type 5. **Beneficial Microbes**, v.9, n.1, p.133-142, 2018.
- SAUTER, S.N. et al. Cytokine expression. in an *ex vivo* culture system of duodenal samples from dogs with chronic enteropathies: modulation by probiotic bacteria. **Domestic Animal Endocrinology**, v.29, p.605-622, 2005.
- SAUTER, S.N. et al. Effects of probiotic bacteria in dogs with food responsive diarrhea treated with an elimination diet. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.90, p.269-277, 2006.
- SCHACHTSIEK, M. et al. Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001T surface protein CPF mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. **Applied Environment Microbiology**, v.70, p.7078-7085, doi: 10.1128/AEM.70.12.7078-7085. 2004.
- SCHMITZ, S. et al. Comparison of TNF α responses induced by Toll-like receptor ligands and probiotic *Enterococcus faecium* in whole blood and peripheral blood mononuclear cells of healthy dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.153, p.170-174, 2013.
- SCHMITZ, S.; SUCHODOLSKI, J. Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre- and synbiotics – what is the evidence? **Veterinary Medicine and Science**, v.2, p.71-94, 2016.
- SOLIMAN, A.H.S. et al. Evaluation of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* for probiotic characteristics. **Middle East Journal of Applied Sciences**, v.5, n.1, p.10-18, 2015.
- STROMPFOVÁ, V. et al. Experimental addition of *Eleutherococcus senticosus* and probiotic to the canine diet. **Central European Journal of Biology**, v.7, p.436-447, 2012.

THOMAS, C.M.; VERSALOVIC, J. Probiotics-host communication: modulation of signaling pathways in the intestine. **Gut microbes**, v.1, n.3, p.148-163, 2010.

VÉLEZ, M.P. et al. Functional analysis of D-alanylation of lipoteichoic acid in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.11, p.3595-3604. Washington, 2007.

VERGIN, F. Anti-und Probiotica. **Hipokrates**, v.25 p.116-119, 1954.

WYNN, S.G. Probiotics in veterinary practice. **Journal of the American Veterinary Medicine**, v.234, n.5, p.606-613, 2009.

3.2 Artigo 2

Efeito da imunomodulação de *Bacillus toyonensis* na resposta vacinal contra Parvovirus tipo 2 em cães.

Helen Cabaldi Franz, Francisco Denis Souza Santos, Vitória Sequeira Gonçalves,
Carolina Litchina Brasil, Maria Eduarda Bicca Dode, Silvia de Oliveira Hübner e
Fábio Pereira Leivas Leite

Será submetido à revista Acta Scientiae Veterinariae

Acta Scientiae Veterinariae

RESEARCH ARTICLE

Efeito da imunomodulação de *Bacillus toyonensis* na resposta vacinal contra Parvovírus tipo 2 em cães.**RESUMO**

Introdução: Probióticos são definidos como microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas promovem benefícios à saúde do hospedeiro. A utilização de probióticos pode trazer benefícios à saúde dos cães, pois a suplementação com determinados microrganismos pode melhorar a eficácia de vacinas através da modulação da resposta imune. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito imunomodulador da suplementação com o probiótico *Bacillus toyonensis* em cães vacinados contra Parvovírus canino tipo 2 (CPV).

Material, métodos & resultados: 10 cães da raça *Australian Cattle Dog* com 45 dias de idade foram divididos aleatoriamente em dois grupos de cinco animais cada, onde um grupo foi suplementado com o probiótico *B. toyonensis* na concentração 2×10^8 esporos viáveis por dia e o outro grupo (controle) recebeu apenas solução salina fosfatada. Os animais foram vacinados contra parvovírus canino tipo 2 e as coletas de sangue para realização de hemogramas e para obtenção de soro ocorreram nos dias 0, 7, 21 e 35 do experimento. Os níveis de imunoglobulinas G (IgG) totais específicas contra o antígeno foram determinados pelo método de ELISA indireto. A suplementação dos cães com *B. toyonensis* foi eficiente em estimular a produção de títulos de anticorpos superiores ($p < 0,05$) quando em comparação aos animais do grupo controle em todos os dias analisados. O hemograma seguiu metodologia que

analisa qualitativa e quantitativamente os eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Os hemogramas revelaram um perfil hematológico esperado para a espécie canina e idade dos animais, porém não foram identificadas diferenças entre os grupos experimentais. Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de cães foram cultivadas e estimuladas com DNA, células vegetativas e esporos de *B. toyonensis*. A técnica de PCR quantitativo foi utilizada para avaliar a transcrição de mRNA das citocinas IL-4, IL-17 e IFN- γ . As PBMCs caninas apresentaram um perfil de transcrição de mRNA das citocinas que variou com o componente utilizado como estímulo.

Discussão: O principal método de prevenção contra a parvovirose canina se dá através da vacinação. Porém, um dos principais fatores que podem afetar a eficácia da vacina é a presença de anticorpos maternos nos filhotes passados pelo colostro, que ocorre no período denominado janela imunológica. São bem vistos os métodos que possam resultar em melhorias dos atuais esquemas vacinais, com a finalidade de que a alta incidência de CPV na população de cães possa ser diminuída. Estudos prévios relataram efeitos de *B. toyonensis* relacionados com o aumento da eficácia de vacinas em outras espécies. Além disso, este microrganismo é favorável para ser utilizado nos processos industriais devido a sua capacidade de formar esporos, que o torna mais resistente ao trato gastrointestinal e aumenta a sua viabilidade na estocagem. Neste estudo, o grupo suplementado com *B. toyonensis* demonstrou níveis de IgG total sérica ($P < 0,05$) contra CPV superiores (aproximadamente 4 vezes) ao grupo controle. Os probióticos podem atuar no sistema imune através da sua capacidade de ativar as células imunes, e estas responderão produzindo e secretando as citocinas. Citocinas são proteínas que tem o potencial de direcionar e regular a resposta imune no organismo. No presente, estudo observamos que quando células de cão foram estimuladas com DNA, células vegetativas e esporos de *B. toyonensis*, apresentou-se um perfil distinto de

transcrição de mRNA de citocinas. Os resultados encontrados sugerem que *B. toyonensis* pode ser uma alternativa para melhorar a proteção dos cães vacinados contra parvovirose.

Palavras-chave: probiótico, vacinação, imunomodulação, anticorpos.

INTRODUÇÃO

Parvovírus canino tipo 2 é um dos patógenos entéricos de maior importância para cães, pois é um vírus extremamente contagioso e de grande incidência em abrigos, canis e petshops [18]. Infecções graves, muitas vezes fatais, são vistas em filhotes de aproximadamente 6 semanas a 6 meses de vida [24]. Os esquemas vacinais conferem imunidade, sendo o principal método de controle da doença [18]. Todavia, a neutralização do vírus vacinal por anticorpos maternos é um dos principais fatores que pode comprometer a efetiva proteção [30]. Neste sentido, a utilização de probióticos pode trazer benefícios, pois estudos com suplementação de cães obtiveram resultados promissores para aumentar a eficácia de vacinas [2] e para modular funções do sistema imune [1].

Probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas promovem benefícios à saúde do hospedeiro [7]. Estimulação da produção de imunoglobulinas, indução do aumento da atividade de macrófagos e linfócitos e influência na produção de citocinas são modos de atuação [23, 20, 32]. *Bacillus toyonensis* é uma bactéria Gram-positiva formadora de esporos e não patogênica [13]. Este microrganismo possui características que podem ser vantajosas para a produção de rações, como a estocagem sem ser necessária a refrigeração e sua capacidade de sobrevivência no trato gastrointestinal [5]. No entanto, há pouca ou nenhuma literatura relatando o efeito de *B. toyonensis* em cães. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito imunomodulador da suplementação com *B. toyonensis* em cães vacinados contra parvovirose.

MATERIAL E MÉTODOS

Probiótico

B. toyonensis foi o probiótico utilizado para a realização desta pesquisa, o qual faz parte da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia do Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Inicialmente, reativou-se a cultura estoque através da semeadura das bactérias em placas de cultivo contendo *Brain Heart Infusion* Ágar¹, as quais foram incubadas a 37 °C por 24 h para o crescimento das colônias. Na sequência, foram inoculadas de 3 a 5 colônias provenientes das placas, em frascos de 500 mL contendo 150 mL de *Brain Heart Infusion* caldo e incubou-se em agitação de 200 rpm por 18 h, para que este cultivo fosse utilizado como inóculo na expansão em biorreator com 3,5 L de meio NYSM [33]. As condições do ambiente no biorreator foram monitoradas com aporte constante de ar entre 0,5 e 1,5 (v/v). A temperatura foi mantida a 37 °C, que durou 96 h, não havendo correções de pH. Ao final deste período, acompanhou-se a evolução do cultivo através da coloração de Gram e quando foram alcançados 90 % de esporulação das bactérias procedeu-se com a centrifugação da cultura em centrífuga Sorvall® RC-6 plus² em 5.000 × g por 20 min a 4 °C com o objetivo de separação do sedimento, o qual foi suspenso em 500 mL de solução fosfato salina tamponada, obtendo-se a concentração de *B. toyonensis* de aproximadamente 2×10⁸ UFC/mL. O controle de pureza foi realizado em todas as fases, utilizando coloração de Gram e através da inoculação em *Brain Heart Infusion* ágar e em ágar sangue ovino a 8 %, como última etapa do processo.

Animais e delineamento experimental

10 cães (sete machos e três fêmeas) da raça *Australian Cattle Dog*, provenientes de duas ninhadas com mães vacinadas, com 45 dias de vida, oriundos de um canil particular, foram divididos aleatoriamente em dois grupos de cinco animais (grupo suplementado e grupo controle) e mantidos com acesso a água e ração (super premium Frost Puppy LB®

Supra³) a vontade. Os animais do grupo suplementado receberam por via oral 1 mL do probiótico *B. toyonensis* na concentração de 2×10^8 esporos viáveis, 1 vez ao dia. O fornecimento do probiótico para o grupo suplementado iniciou-se no dia 0 do experimento (7 dias antes da primeira vacinação) e estendeu-se até o final do experimento (dia 35), e para aqueles do grupo controle foi administrado apenas solução salina fosfatada.

A vacinação dos cães seguiu o esquema estabelecido no canil, o qual preconiza o uso da vacina Vanguard[®] HTLP 5/CV-L⁴. Esta vacina possui como composição: fração liofilizada de cepas atenuadas do vírus da cinomose canina, adenovírus canino tipo 2, vírus da parainfluenza canina, parvovírus canino e culturas inativadas de *Leptospira* (*L. canicola* e *L. icterohaemorrhagiae*) a serem diluídas com uma vacina inativada de coronavírus canino, tendo o hidróxido de alumínio como adjuvante. Os cães receberam duas doses da vacina pela via subcutânea com intervalo de 21 dias, nos dias 7 e 28 do experimento. Amostras de sangue com o anticoagulante ácido etileno diamino tetra cético (EDTA), foram obtidas nos dias 0, 7, 21 e 35 do experimento para realização de hemograma e obtenção do soro.

Hemograma

A metodologia para a realização desta análise seguiu-se como a recomendada, que divide o exame em eritrograma, leucograma e plaquetograma [30]. O eritrograma compreende os seguintes parâmetros: número total de hemácias/ μL , concentração de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina média. O estudo do leucograma engloba as contagens total e diferencial de leucócitos. Todos os parâmetros previamente descritos foram realizados em equipamento hematológico automático Poch – 100iVDiff^{®5} específico para área veterinária. A análise morfológica das hemácias e o diferencial leucocitário foram realizados mediante a observação microscópica de esfregaços sanguíneos devidamente corados.

Avaliação da resposta imune humoral contra parvovírus canino

A avaliação dos níveis de IgG totais foi realizada através do ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. Placas de poliestireno Costar[®] 6 com 96 cavidades foram sensibilizadas com 50 µL do parvovírus canino inativado com o título de 128 unidades hemaglutinantes (UHA) diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6. Foi realizada a titulação dos soros individuais dos animais de cada grupo experimental do dia 35 com a finalidade de detectar qual a melhor diluição a ser utilizada para a realização do teste nos demais dias de coleta. As amostras de soro foram diluídas em série na base dois iniciando-se em 1:60 até a diluição de 1:61440, em solução salina fosfatada pH 7,6 contendo Tween 20 a 0,05 % (PBS-T). Utilizou-se o conjugado de imunoglobulina de coelho, anti-dog IgG conjugada com peroxidase⁷ diluído 1/4000 em PBS-T. Resumidamente as placas foram sensibilizadas com o antígeno por 18 h a 4 °C, sendo que após foram realizadas três lavagens com PBS-T pH 7,6 e incubou-se a placa por 60 min a 37 °C com 50 µl de soro de cada cão (em duplicata). Na sequência, a placa foi novamente lavada três vezes com PBS-T e então, foi adicionado 50 µl do conjugado diluído em PBS-T incubando-se por mais 90 min a 37 °C. Por fim, a placa passou por mais cinco lavagens com PBS-T e em seguida foi adicionado 50 µl de substrato/cromógeno, ocorrendo a reação em temperatura ambiente por 15 min no escuro. As absorbâncias foram aferidas em um leitor de microplacas TP-Reader⁸ a 492 nm. Levando em consideração a diferença estatística entre os grupos, optou-se pela diluição 1:960 para ser utilizada para a realização do teste nos outros dias de coleta.

Cultivo de células mononucleares do sangue periférico e extração de RNA

Foram coletados 20 mL de sangue periférico de cães saudáveis em tubos contendo o anticoagulante EDTA, o qual foi diluído com igual parte de meio RPMI 1640.⁹ O sangue diluído foi sobreposto em igual volume de Histopaque^{®10} e procedeu-se uma centrifugação de 30 min a 500 x g. Formou-se uma banda celular, que foi transferida para outro tubo de ensaio e lavada por três vezes em RPMI 1640. As células foram ressuspensas na concentração de

5×10^7 células/mL em RPMI 1640 contendo 20 % de soro fetal bovino e foram plantadas em placas de 96 cavidades¹¹, sendo incubadas por 2 h a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO₂. Na sequência, foram adicionados separadamente os seguintes estímulos na cultura de células: 10 µg/mL de concanavalina A (ConA)⁷, RPMI 1640, 5 µg/mL de DNA de *B. toyonensis*, 10^6 células vegetativas de *B. toyonensis* e 10^6 esporos de *B. toyonensis*. A ConA e o RPMI 1640 serviram como controle positivo e negativo, respectivamente. Passado o período de incubação, houve o descarte do sobrenadante e as células foram coletadas em TRIzol® reagente¹². O RNA das células estimuladas foi extraído pelo método TRIzol de acordo com as instruções do fabricante.

Síntese de cDNA e Real Time PCR

Foram utilizados 400 ng de RNA para a síntese de cDNA, a reação foi realizada conforme as instruções do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*¹³. As reações da Real time PCR foram realizadas com 1 µL de cDNA, 5 µL de GoTaq® qPCR¹⁴, 0,25 de cada oligômero iniciador e 3,5 µL água livre de RNase, sendo realizada na plataforma STRATAGENE M×3005P® real-time PCR system¹⁵ nas condições de temperatura e tempo já descritas [6]. Foram analisadas as quantidades de transcritos de mRNA das citocinas IL-4, IL-17 e IFN-γ, onde o GAPDH foi utilizado como gene de referência. As sequências dos oligoiniciadores (primers) utilizados para a amplificação do gene das citocinas estão apresentadas na tabela 1. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. A partir dos valores de Threshold Cycle (Ct) obtidos, foi calculada a transcrição relativa dos genes pela comparação com a expressão do GAPDH, de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ [15].

Tabela 1 – Sequência de oligoiniciadores utilizados para a amplificação do gene das citocinas.

Oligoiniciadores	Anterógrado	Retrógrado	Referência
GAPDH	CCCACCTCTCCACCTTCGAC	CCTTGGAGGCCATGTAGACC	Hassanpour (2017)
IL-4	TGGGTCTCACCTCCCAACTG	GTCAGCTCCATGCACGAGTC	Hassanpour (2017)
IL-17	TCCCCATCCAGCAAGAGATC	CCACATGGCGAACAATAGGG	Desenhado pelo grupo
IFN-γ	GCCGTCAGATGGGTTGTACC	TCTGGTAGGAGACGGCGAAG	Hassanpour (2017)

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados com auxílio do programa *GraphPad Prism* 7¹⁶. Os valores dos títulos de anticorpos totais dos cães de cada grupo experimental, obtidos pelo ELISA indireto, foram submetidos a análise de variância (two-way ANOVA), seguido pelo Teste de Tukey.

RESULTADOS

Hemogramas

Os parâmetros hematológicos encontrados nos cães demonstraram um perfil esperado para a espécie canina e idade dos animais, não diferindo entre o grupo suplementado com o *B. toyonensis* e o controle.

Dinâmica da resposta imune humoral contra parvovírus canino

A concentração dos níveis de anticorpos do dia 35 está representada na Figura 1. Os níveis de anticorpos do grupo suplementado foram maiores em todas as diluições dos soros dos animais neste dia, sendo que houve significância estatística ($p < 0,05$) nas diluições 1:960, 1:1920, 1:3840, 1:7680, 1:15360, 1:30720 e 1:61440. A suplementação dos cães com *B. toyonensis* foi eficiente em estimular uma produção de títulos de anticorpos aproximadamente 4 vezes maiores em relação ao grupo controle.

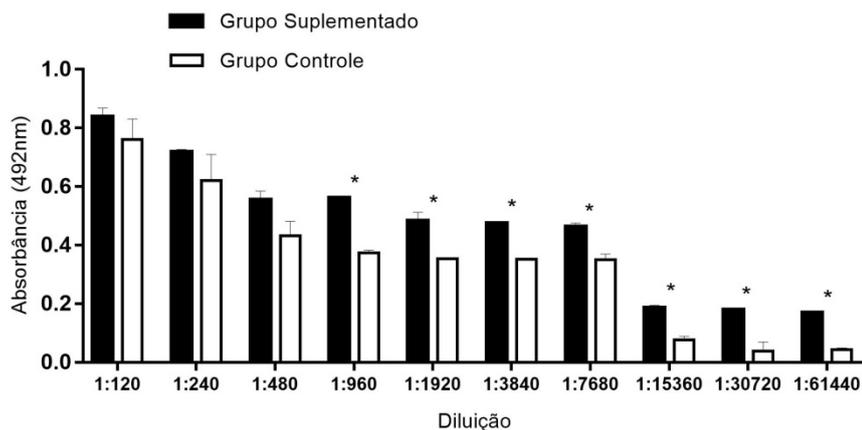


Figura 1 - Níveis de IgG totais das diluições dos soros de cães vacinados contra parvovírus canino. Os dados foram representados como os valores das médias dos grupos das diluições no dia 35 na absorvância de 492nm. A análise estatística foi realizada pelo teste two-way ANOVA seguido de teste de Tukey. Os asteriscos significam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais.

A Figura 2 demonstra a dinâmica dos níveis totais de IgG na diluição 1:960. Os cães de ambos os grupos experimentais responderam à vacinação com o aumento na produção de IgG totais. A suplementação dos cães com *B. toyonensis* foi eficiente em estimular a produção de títulos de anticorpos superiores ($p < 0,05$) quando em comparação aos animais do grupo controle em todos os dias de coleta após o início da suplementação. No dia 21 se observou a maior diferença entre os grupos e, não foram observadas quedas nos níveis de anticorpos no período estudado.

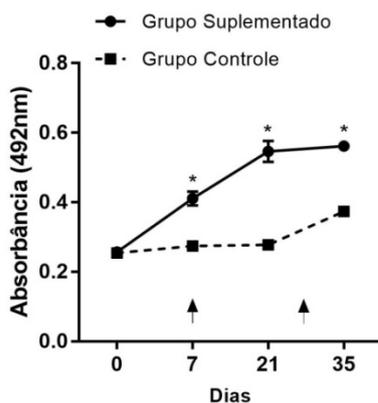


Figura 2 - Dinâmica dos níveis de IgG totais de cães vacinados contra parvovírus canino. Os dados foram representados como os valores das médias dos grupos na diluição 1:960 na absorbância a 492nm. As flechas indicam as vacinações nos dias 7 e 28, respectivamente. A análise estatística foi realizada pelo teste two-way ANOVA seguido de teste de Tukey. Os asteriscos significam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais nos dias 7, 21 e 35 do experimento.

Transcrição de mRNA das citocinas

Com o objetivo de avaliar se *B. toyonensis* estimulavam a transcrição de citocinas em PBMCs de cães. PBMCs de cães adultos saudáveis foram isoladas e estimuladas com esporos, DNA ou células vegetativas. Foi possível observar que esporos de *B. toyonensis* induziram a transcrição de mRNA das citocinas IL-4 (4,4 vezes), IL-17 (1,3 vezes) e IFN- γ (1,6 vezes). A estimulação com o DNA levaram a transcrição de mRNA das citocinas IL-4 (4,7 vezes), IL-17 (3,5 vezes) e IFN- γ (2 vezes). Por fim, as células vegetativas foram responsáveis por induzir a transcrição de mRNA das citocinas IL-4 (1,7 vezes), IL-17 (3,15 vezes) e IFN- γ (1,2 vezes) (Figura 3).

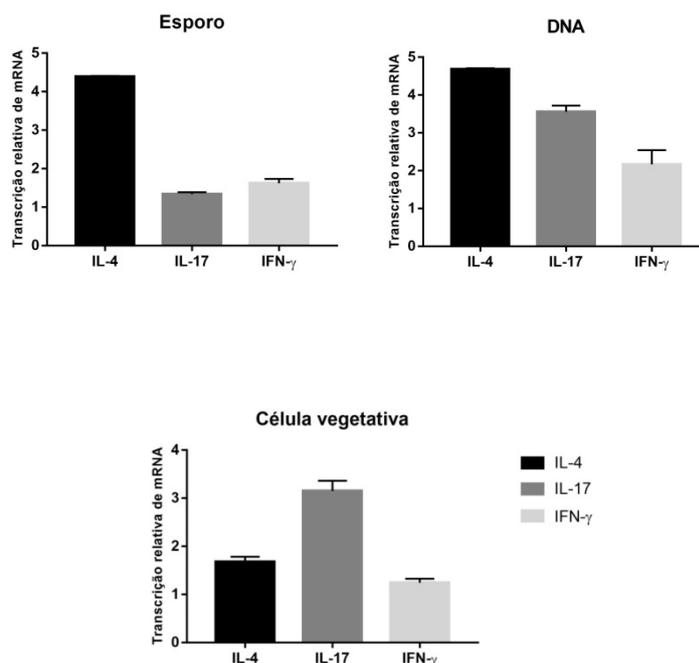


Figura 3 - Transcrição de mRNA das citocinas IL-4, IL-17 e IFN- γ em PBMCs caninas. As células foram estimuladas *in vitro* com esporos, DNA e células vegetativas de *B. toyonensis*. O RNA total foi extraído e o cDNA submetido ao qPCR. A transcrição relativa dos genes IL-4, IL-17 e IFN- γ foi calculada a partir dos valores do Threshold Cycle (Ct), através da comparação com a transcrição do gene endógeno GAPDH de referência.

DISCUSSÃO

Apesar dos grupos experimentais não diferirem quanto aos parâmetros hematológicos, vale ressaltar a importância da realização do hemograma neste estudo. Juntamente das observações clínicas, foi possível acompanhar a evolução do estado de saúde dos filhotes no decorrer do experimento. Nossos resultados demonstram que os filhotes apresentaram uma dinâmica de aumento gradual no perfil da série vermelha. A literatura relata que em torno de 2 meses de idade pode ser observado um aumento progressivo de hemácias, hematócrito e hemoglobina, quando aqueles de referência para adultos são alcançados em torno dos 6 meses [31]. Com relação à série branca, poucas mudanças foram observadas, sendo detectada apenas linfocitose pouco intensa. A literatura indica que a análise diferencial dos leucócitos para

filhotes se mantêm na mesma faixa de cães adultos [10,31] e as linfocitoses fisiológicas são resultantes da imune estimulação [31], que pode ser ocasionada pela vacinação. A vacinação é o principal método de profilaxia contra a parvovirose canina e os esquemas vacinais incluem repetidas doses da vacina para reforçar a proteção dos animais [29]. A presença de anticorpos maternos, passados pelo colostro, pode ser considerada como potencial interferente na efetividade imunológica proposta pela vacina [3,29]. A alta incidência de CPV na população de cães pode ser reduzida com a adoção de métodos que curse com melhorias dos atuais esquemas vacinais [19].

No presente estudo, os filhotes de cães foram vacinados contra parvovirose e foi possível observar o efeito imunomodulador ocasionado pela suplementação com *B. toyonensis*. O grupo suplementado com o probiótico demonstrou níveis de IgG ($P < 0,05$) mais altos do que aqueles encontrados nos animais do grupo controle, revelando uma modulação da resposta imune humoral desde a primeira vacinação (quando os animais já haviam sido suplementados por 7 dias) e que foi duradoura até o final do período experimental. Sendo que os animais de ambas as ninhadas possuíam níveis similares de anticorpos maternos, observados no dia 0. Em relação a outros resultados com cães, temos o aumento da concentração de IgG específica contra cinomose canina em um estudo onde foi realizada a suplementação de filhotes com *Enterococcus faecium* na concentração de 5×10^8 UFC/dia [2]. Outra pesquisa também revelou o incremento de IgG no soro de cães que foram suplementados por 4 semanas com *Lactobacillus acidophilus* na concentração de $>10^9$ UFC/dia [1].

Bacillus toyonensis é uma bactéria que há décadas é utilizada na nutrição animal [13]. Sua característica de formação de esporos é um fator favorável para a sua utilização nos processos industriais [5]. Estudos prévios já apontaram seus efeitos relacionados com o aumento da eficácia de vacinas em outras espécies. Resultados semelhantes aos nossos foram

observados quando camundongos foram suplementados com este microrganismo e vacinados com uma vacina replicante contra parvovírus canino, sendo que houve uma maior soroconversão contra o parvovírus canino nos animais suplementados [4]. Ovinos vacinados e suplementados com *B. toyonensis* obtiveram maiores títulos contra o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5), sendo que, assim como o que foi observado no nosso experimento, estes níveis se mantiveram mais elevados durante todo o período experimental [26]. Podemos citar outro estudo mais recentemente, onde a suplementação com *B. toyonensis* foi capaz de modular a resposta imune de camundongos vacinados com uma vacina recombinante contra BoHV-5, sendo observado o aumento nos níveis de imunoglobulinas totais no soro em comparação ao grupo controle [27].

Foi intenção do estudo, através da estimulação das PBMCs caninas, contribuir para o esclarecimento de como o probiótico *B. toyonensis* pode modular a resposta imune. A literatura indica que os probióticos tem a capacidade de ativar as células imunes, e estas responderão produzindo e secretando as citocinas [32]. Citocinas são proteínas que tem o potencial de direcionar e regular a resposta imune no organismo [11]. Após a ingestão, o microrganismo probiótico chega ao maior órgão imunológico que é o trato digestório [28]. Neste ambiente, os probióticos encontram as células dendríticas que são cruciais na conexão da imunidade inata e adaptativa [14], além de interagir com as células epiteliais intestinais, linfócitos e macrófagos [8]. Receptores de reconhecimento de padrões (PRR), como os Toll-like, estão nas células dendríticas (DCs), fazendo com que estas células sejam capazes de reconhecer e responder a certos padrões que são associados à célula bacteriana, que neste caso é o probiótico. A partir disso, são ativadas vias de sinalização nas DCs, que respondem secretando as citocinas que irão atuar sobre os Linfócitos T auxiliares (LTh). Então, estes linfócitos direcionaram qual o tipo de resposta que será desencadeada, podendo ser Th1, Th2, Th17 ou Treg [14, 9].

O IFN- γ é uma importante citocina relacionada com a ativação de macrófagos, células Natural Killer e melhora a apresentação de antígenos por aumentar a expressão de MHC II nas células apresentadoras de antígenos [21]. A presença desta citocina sugere uma polarização para a via de diferenciação Th1, a qual é indispensável para o controle de patógenos intracelulares [21], sendo essencial em uma resposta imune contra vírus. A citocina IL-4 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 [21, 22]. IL-4 desempenha papel essencial na mudança de classe dos linfócitos B para secretar a IgE, que é responsável por ativar células imunes inatas, como os basófilos e mastócitos [22]. Por fim, a IL-17 é uma citocina eficiente indutora de inflamação, gerando a infiltração celular e a produção de outras citocinas pró-inflamatórias [16]. O subtipo de linfócitos Th17 foi descoberto mais recentemente e apresenta-se como importante na proteção contra infecção por microrganismos extracelulares [17]. Nós analisamos neste estudo que quando as PBMCs caninas foram estimuladas com o DNA, com células vegetativas e com os esporos de *B. toyonensis* houve a expressão dessas importantes citocinas citadas acima, que são capazes de atuar junto ao LTh. Esta observação tem sua importância em sugerir que há uma estimulação independente do componente. Diferentes porções deste microrganismo podem estar envolvidas e se sobrepõem para a promoção da modulação da resposta imunológica. Em um estudo conduzido com cães acometidos por enteropatia crônica em que foram coletadas amostras de duodeno por endoscopia e as células foram cultivadas junto a uma composição probiótica composta por três *Lactobacillus* spp., foi constatado o aumento de IFN- γ em resposta ao estímulo probiótico, ainda que este aumento não tenha sido significativo em relação ao grupo controle [28]. Resultados similares aos nossos foram alcançados em estudos conduzidos com camundongos suplementados com *B. toyonensis*, onde os esplenócitos foram cultivados e, houve a detecção de transcrição de IL-4 [27] e de IFN- γ [25]. Em uma pesquisa

semelhante conduzida com ovinos, os níveis de transcrição de mRNA da citocina IL-17, IFN- γ e IL-4 foram mais altos ($p > 0,05$) que o controle [26].

CONCLUSÃO

Esquemas vacinais são indispensáveis para a prevenção de doenças infecciosas como a parvovirose. Para a otimização dos esquemas vacinais, fatores como a janela imunológica devem ser considerados, especialmente em canis infectados [3,19]. A suplementação com *B. toyonensis* é um método que pode trazer benefícios por melhorar a resposta à vacinação [25,27] e ser um microrganismo vantajoso para a incorporação nas rações nos processos industriais [5]. No presente estudo observamos o aumento de IgG mediado pela suplementação com *B. toyonensis*, o que pode sugerir uma amplificação da resposta vacinal contra a parvovirose. Entretanto, mais pesquisas devem ser realizadas para que os mecanismos de atuação deste microrganismo probiótico sejam elucidados, bem como para que sejam esclarecidos como ocorrem seus efeitos benéficos na espécie canina.

MANUFACTURES

¹Neogen Lansing. Michigan, Estados Unidos da América.

²Sorvall® RC-6 plus. Langenselbold, Alemanha.

³Alisul alimentos. São Leopoldo. Brasil.

⁴Zoetis. Lincoln, Estados Unidos da América.

⁵Sysmex corporation. Kobe, Japão.

⁶Corning incorporated. Nova York, Estados Unidos da América.

⁷Sigma-aldrich. Israel.

⁸Thermo Plate. Rio de Janeiro, Brasil.

⁹Gibco. Grand Island, Nova York, Estados Unidos da América.

¹⁰ Sigma Aldrich Brasil Ltda. São Paulo, Brasil.

¹¹ Kasvi. São José dos Pinhais, Brasil.

¹² Life Technologies Carlsbad. California, Estados Unidos da América.

¹³ Applied Biosystems. Foster City, California, Estados Unidos da América.

¹⁴ Promega Corporation. Madison, Estados Unidos da América.

¹⁵ Agilent Technologies. Santa Clara, Estados Unidos da América.

¹⁶ GraphPad Software. California, Estados Unidos da América.

Acknowledgements. Professora Dra. Luciana Bicca Dode pela colaboração com os cães.

Ethical approval. Todos os protocolos foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA Número 3246) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). O CEEA é aprovado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERÊNCIAS

- 1 Baillon M.L.A., Marshall-jones Z.V. & Butterwick R.F. 2004.** Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* strain DSM13241 in healthy adult dogs. *American Journal of Veterinary*. 65(3):338-343.
- 2 Benyacoub J., Czarnecki-maulden G.L., Cavadini C., Sauthier t., Anderson R.E., Schiffrin E.J. & Von der Weid T. 2003.** Supplementation of Food with *Enterococcus faecium* (SF68) Stimulates Immune Functions in Young Dogs. *The Journal of Nutrition*. 133:1158-1162.

- 3 Buonavoglia C., Tollis M., Buonavoglia D. & Puccini A. 1992.** Response of pups with maternal derived antibody to modified-live canine parvovirus vaccine. *Comparative Immunology, Microbiology Infectious Diseases*. 15:281–283.
- 4 Coppola M.M., Conceição F.R. & Gil-Turnes C. 2005.** Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. Toyoi on the humoral and cellular response of mice to vaccines. *Food and Agricultural Immunology*. 16(3):213-219.
- 5 Cutting S.M. 2011.** *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*. 28:214-220.
- 6 De Avila L.F.D.C., De Leon P.M.M., De Moura M.Q., Berne M.E.A., Scaini C.J. & Leivas Leite F.P. 2016.** Modulation of IL-12 and IFN γ by probiotic supplementation promotes protection against *Toxocara canis* infection in mice. *Parasite Immunology*. 38:326-330.
- 7 Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO), 2002.** Guidelines or the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Available at: <http://tinyurl.com/zdbrkeg>.
- 8 Forsythe P. & Bienenstock J. 2010.** Immunomodulation by commensal and probiotic bacteria. *Immunological Investigation*. 39:429-448.
- 9 Gómez-llorente C., Munoz S. & Gil A. 2010.** Role of Toll-like receptors in the development of immunotolerance mediated by probiotic. *Proceedings of the Nutrition Society*. 69:381–389.
- 10 Grundy S.A. 2006.** Clinically Relevant Physiology of the Neonate. *Veterinary Clinics Small Animal*. 36:443-459.
- 11 Gulati K., Guhathakurta S., Joshi J., Rai N. & Ray A. 2016.** Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview. *MOJ Immunology*. 4(2):00121.

- 12 Hassanpour H., Bigham Sadegh A., Karimi I., Heidari Khoei H., Karimi A., Edalati Shaarbaf P. & Karimi Shayan T. 2017.** Comparative expression analysis of HSP70, HSP90, IL-4, TNF, KITLG and KIT-receptor gene between varicocele-induced and non-varicocele testes of dog. *International Journal of Fertility and Sterility*. 11(3):148-155.
- 13 Jiménez G., Urdiain M., Cifuentes A., López-López A., Blanch A.R., Tamames J., Kämpfer P., Kolstø A.B., Ramón D., Martínez J.F., Codoner F.M. & Rosselló-Móra R. 2013.** Description of *Bacillus toyonensis* s.p nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Systematic and Applied Microbiology*. 36:383-391.
- 14 Lebeer S., Vanderleyden J. & De keersmaecker S.C.J. 2010.** Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Review Microbiology*. 8:171–184.
- 15 Livak K.J. & Schmittgen T. 2001.** D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 25:402-408.
- 16 Mesquita Jr. D., Cruvinel W.M., Câmara N.O.S., Kállas E.G. & Andrade L.E.C. 2009.** Autoimmune diseases in the TH17 era. *Brazilian Journal Medical Biological Research*. 42(6):476-486.
- 17 Mesquita Júnior D., Araújo J.A.P., Catelan T.T.T., Souza A.W.S., Cruvinel W.M., Andrade L.E.C. & Silva N.P. 2010.** Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 50(5):552-580.
- 18 Miranda C. & Thompson G.J. 2016.** Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. *Journal of General Virology*. 97(9):2043–2057.

- 19 Nova B.V., Cunha E., Sepúlveda N., Oliveira M., São Braz B., Tavares L., Almeida V. & Gil S. 2018.** Evaluation of the humoral immune response induced by vaccination for canine distemper and parvovirus: a pilot study. *BMC Veterinary Research*. 14:348.
- 20 Oelschlaeger T. A. 2010.** Mechanisms of probiotic actions – A review. *International Journal of Medical Microbiology*. 300:57–62.
- 21 Parkin J. & Cohen B. 2001.** An overview of the immune system. *Lancet*. 357:1777-89.
- 22 Paul W.E. & Zhu J. 2010.** How are Th2-type immune responses initiated and amplified? *Nature Reviews Immunology*. 10:225–235. doi:10.1038/nri2735
- 23 Peluso I., Fina D., Caruso R., Stolfi C., Caprioli F., Fantini M.C., Caspani G., Grossi E., Di Iorio L., Paone F.M., Pallone F. & Monteleone G. 2007.** *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* B21060 suppresses human T-cell proliferation. *Infection and immunity*. 75(4):1730-1737.
- 24 Prittie J. 2004.** Canine parvoviral enteritis: A review of diagnosis, management, and prevention. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 14(3):167–176.
- 25 Roos T.B., De Lara A.P.S.S., Dummer L.A., Fischer G. & Leivas Leite F.P. 2012.** The immune modulation of *Bacillus cereus* var. Toyoi in mice immunized with experimental inactivated Bovine Herpesvirus Type 5 vaccine. *Vaccine*. 30:2173-2177.
- 26 Roos T.B., Moraes C.M., Sturbelle R.T., Dummer L.A., Fisher G. & Leivas Leite F.P. 2018.** Probiotics *Bacillus toyonensis* and *Saccharomyces boulardii* improve the vaccine immune response to Bovine herpesvirus type 5 in sheep. *Research in Veterinary Science*. 117:260-265.
- 27 Santos F.D.S., Menegon Y.A., Piraine R.E.A., Rodrigues P.R.C., Cunha R.C. & Leivas Leite F.P. 2018.** *Bacillus toyonensis* improves immune response in the mice vaccinated with recombinant antigen of bovine herpesvirus type 5. *Beneficial Microbes*. 9(1):133-142.

- 28 Sauter S.N., Allenspach K., Gaschen F., Grone A., Ontsouka E. & Blum J.W. 2005.** Cytokine expression. in an *ex vivo* culture system of duodenal samples from dogs with chronic enteropathies: modulation by probiotic bacteria. *Domestic Animal Endocrinology*. 29:605–622.
- 29 The world small animal veterinary association. 2016.** Diretrizes para a vacinação de cães e gatos. *Journal of Small Animal Practice*. 57:1-50.
- 30 Thrall M.A., Weiser G., Allison R.W., Campbell T.W. 2015.** *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 677p.
- 31 Von Dehn B. 2014.** Pediatric Clinical Pathology. *Veterinary Clinics Small Animal*. 44:205-219.
- 32 Wynn S.G. 2009.** Probiotics in veterinary practice. *Journal of the American Veterinary Medicine*. 234(5):606-613.
- 33 Yousten A.A. 1984.** *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. *Advances in Biotechnological Processes*. 3:315-343.

4 Considerações Finais

Os resultados obtidos através da revisão de literatura permitem concluir que muitos dos estudos conduzidos na espécie canina tiveram como objetivo avaliar o efeito dos probióticos quando os cães passavam por perturbações relacionadas ao trato gastrointestinal, sendo procedidas observações principalmente clínicas. De fato, poucas pesquisas tinham a finalidade de esclarecer os mecanismos de atuação dos probióticos nesta espécie animal, o que ressalta a importância de que estudos com animais saudáveis e com um maior controle sejam realizados. Também foi possível constatar benefícios adicionais gerados por probióticos que já foram alcançados em humanos e, devido a isso, existe um amplo campo de estudo a fim de verificar se estes efeitos se estendem a espécie canina.

Este estudo concluiu que a suplementação com *B. toyonensis* foi capaz de modular a resposta imune humoral de cães vacinados contra a parvovirose e que a estimulação das PBMCs caninas com componentes do *B. toyonensis* resultou na transcrição de mRNA de um perfil das citocinas IL-4, IL-17 e IFN- γ que diferiu conforme o estímulo aplicado.

Referências

ARSLAN, H. H.; SARIPINAR, A. D.; TERZI, G.; NISBET, C. Therapeutic effects of probiotic bacteria in parvoviral enteritis in dogs. **Revue De Medecine Veterinaire**, v.163, p.55–59, 2012.

BAILLON, M. L. A.; MARSHALL-JONES, Z. V.; BUTTERWICK, R. F. Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* strain DSM13241 in healthy adult dogs. **American Journal of Veterinary**, v.65, n.3, p.338-343, 2004.

BALAKRISHNAN, M.; FLOCH, M. H. Prebiotics, probiotics and digestive health. **Current Opinion Clinical Nutrition Metabolic Care**, v.15, n.6, p.580-585, 2012.

BENYACOUB, J.; CZARNECKI-MAULDEN, G. L.; CAVADINI, C.; SAUTHIER, T.; ANDERSON, R. E.; SCHIFFRIN, E. J.; VON DER WEID, T. Supplementation of Food with *Enterococcus faecium* (SF68) Stimulates Immune Functions in Young Dogs. **The Journal of Nutrition**, v.133, p.1158-1162, 2003.

BIERBAUM, G.; SAHL, H. G. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.10, p.2–18, 2009.

BRESCIANI, F. MARCO, P. Efficacy of *Saccharomyces boulardii* in the treatment of dogs with chronic enteropathies - randomized double-blind placebo-controlled study. European College of Veterinary Internal Medicine - **Companion Animals Congress Proceedings**, 2014.

BUONAVOGLIA, C.; TOLLIS, M.; BUONAVOGLIA, D.; PUCCINI, A. Response of pups with maternal derived antibody to modified-live canine parvovirus vaccine. **Comparative Immunology, Microbiology Infectious Disease**, v.15, p.281–283, 1992.

BUTS, J. P.; KEYSER, N. D. Effects of *Saccharomyces boulardii* on Intestinal Mucosa. **Digestive Disease and Sciences**, p.1485-1492, 2006.

BYBEE, S. N.; SCORZA, A. V.; LAPPIN, M. R. Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* SF68 on presence of diarrhea in cats and dogs housed in an animal shelter. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.25, p.856-860, 2011.

COPPOLA, M. M.; CONCEIÇÃO, F. R.; C. GIL-TURNES. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. Toyoi on the humoral and cellular response of mice to vaccines. **Food and Agricultural Immunology**, Basingstoke, v.16, n.3, p.213-219, 2005.

CUTTING, Simon M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**, v.28, p.214-220, 2011.

DE AVILA, L. F. D. C.; DE LEON, P. M. M.; DE MOURA, M. Q.; BERNE, M. E. A.; SCAINI, C. J.; LEIVAS LEITE, F. P. Modulation of IL-12 and IFN γ by probiotic supplementation promotes protection against *Toxocara canis* infection in mice. **Parasite Immunology**, v.38, p.326-330, 2016.

FORSYTHE, P.; BIENENSTOCK, J. Immunomodulation by commensal and probiotic bacteria. **Immunological Investigation**, v.39, p.429-448, 2010.

GIBSON, G. R.; MCCARTNEY, A. L.; RASTALL, R. A. Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections. **British Journal of Nutrition**, London, v.93, n.1, p.31-34, 2005.

GRZESKOWIAK, Ł.; ENDO, A.; BEASLEY, S.; SALMINEN, S. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. **Anaerobe**, v.34, p.14-23, 2015.

GÓMEZ-LLORENTE, C.; MUNOZ, S.; GIL, A. Role of Toll-like receptors in the development of immunotolerance mediated by probiotic. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.69, p.381-389, 2010.

GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. The skin microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v.9, p. 244-253, 2011.

GRUNDY, S. A. Clinically Relevant Physiology of the Neonate. **Veterinary Clinics Small Animal**, v.36, p.443-459, 2006.

GULATI, K.; GUHATHAKURTA, S.; JOSHI, J.; RAI, N.; RAY, A. Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview. **MOJ Immunology**, v.4, n.2, p.121, 2016.

HAMLIN, J. The use of probiotics as dietary supplements in dogs. **The Veterinary Nurse**, v.2, n.2, p.82-87, 2011.

HASSANPOUR, H.; BIGHAM SADEGH, A.; KARIMI, I.; HEIDARI KHOEI, H.; KARIMI, A.; EDALATI SHAARBAF, P.; KARIMI SHAYAN, T. Comparative expression analysis of HSP70, HSP90, IL-4, TNF, KITLG and KIT-receptor gene between varicocele-induced and non-varicocele testes of dog. **International Journal of Fertility and Sterility**, v.11, n.3, p.148-155, 2017.

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

HERSTAD, H. K.; NESHEIM, B. B.; L'ABÉE-LUND, T.; LARSEN, S.; SKANCKE, E. Effects of a probiotic intervention in acute canine gastroenteritis – a controlled clinical trial. **Journal of Small Animal Practice**, v.51, p.34-38, 2010.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews. Gastroenterology Hepatology**, v.11, p.506–514, 2014.

HONDA, K.; LITTMAN, D. R. The microbiome in infectious disease and inflammation. **Annual Review Immunology**, v.30, p.759-95, 2012.

JIMÉNEZ, G.; URDIAIN, M.; CIFUENTES, A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; BLANCH, A. R.; TAMAMES, J.; KÄMPFER, P.; KOLSTØ, A.; RAMÓN, D.; MARTÍNEZ, J. F.; CODONER, F. M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Description of *Bacillus toyonensis* s.p nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. **Systematic and Applied Microbiology**, v.36, p.383-391, 2013.

KELLEY, R. L.; MINIKHIEM, D.; KIELY, B.; O'MAHONY, L.; O'SULLIVAN D.; BOILEAU, T.; PARK, J. S. Clinical benefits of probiotic canine-derived *Bifidobacterium animalis* strain HC7 in dogs with acute idiopathic diarrhea. **Veterinary Therapeutics**, v.10, p.121-130, 2009.

KULP, W. L.; RETTGER, L. F. Comparative Study of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Bacteriology**. v.9, n.4, p.357-95, 1924.

LAVERMICOCCA, P.; VALERIO, F.; LONIGRO, S. L.; DE ANGELIS, M.; MORELLI, L.; CALLEGARI, M. L.; RIZZELLO, C. G.; VISCONTI, A. Study of adhesion and survival of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.8, p.4233–4240, 2005.

LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. **Nature Review Microbiology**, v.8, p.171–184, 2010.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v.147, p.747-748, 1965.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

MACKOWIAK, Philip A. Recycling Metchnikoff: probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. **Frontiers in public health**, v.1, p.1-3, 2013.

MAKRAS, L.; TRIANTAFYLLOU, V.; FAYOL-MESSAOUDI, D.; ADRIANY, T.; ZOUMPOPOULOU, G.; TSAKALIDOU, E.; SERVIN, A.; DE VUYST, L. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. **Research in Microbiology**, v.157, p.241-247, 2006.

MARCINÁKOVÁ, M.; SIMONOVÁ, M.; STROMPFOVÁ, V.; LAUKOVÁ, A. Oral application of *Enterococcus faecium* strain EE3 in healthy dogs. **Folia Microbiologica**, v.51, p.239-242, 2006.

MARTINS, A. K. S.; MARTINS, F. S.; GOMES, D. A.; ELIAN, S. D. A.; VIEIRA, A. T.; TEIXEIRA, M. M.; CARA, D. C.; NARDI, R. M. D.; NICOLI, J. R. Evaluation of in vitro antagonism and of in vivo immune modulation and protection against pathogenic experimental challenge of two probiotic strains of *Bifidobacterium animalis* var. lactis. **Archives of Microbiology**, v.192, p.995-1003, 2010.

MESQUITA JÚNIOR, D.; CRUVINEL, W. M.; CÂMARA, N. O. S.; KÁLLAS, E. G.; ANDRADE, L. E. C. Autoimmune diseases in the TH17 era. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v.42, n.6, p.476-486, 2009.

MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; CRUVINEL, W. M.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.50, n.5, p.552-580, 2010.

MINELLI E. B.; BENINI A. Relationship between number of bacteria and their probiotic effects. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.20, p.180-183, 2008.

MIRANDA, C.; THOMPSON, G. J. Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. **Journal of General Virology**, v.97, n.9, p.2043–2057, 2016.

NOVA, B. V.; CUNHA, E.; SEPÚLVEDA, N.; OLIVEIRA, M.; SÃO BRAZ, B.; TAVARES, L.; ALMEIDA, V.; GIL, S. Evaluation of the humoral immune response induced by vaccination for canine distemper and parvovirus: a pilot study. **BMC Veterinary Research**, v.14, p.348, 2018.

OELSCHLAEGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions—A review. **International Journal Medical Microbiology**, v.300, p.57–62, 2010.

O'MAHONY, D. O.; MURPHY, K. B.; MACSHARRY, J.; BOILEAU, T.; SUNVOLD, G.; REINHART, G.; KIELY, B.; SHANAHAN, F.; O'MAHONY, L. Portrait of a canine probiotic *Bifidobacterium* - from gut to gut. **Veterinary Microbiology**, v.139, p.106 - 112, 2009.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. London, Ontario, Canada. 11p. April 30 and May 1, 2002.

OUWEHAND, A. C. A review of dose-responses of probiotics in human studies. **Beneficial Microbes**, v.8, p.143-151, 2017.

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **Lancet**, v.357, p.1777-89, 2001.

PAUL, W. E.; ZHU, J. How are Th2-type immune responses initiated and amplified? **Nature Reviews Immunology**, v.10, p.225–235, 2010.

PELUSO, I.; FINA, D.; CARUSO, R.; STOLFI, C.; CAPRIOLI, F.; FANTINI, M. C.; CASPANI, G.; GROSSI, E.; DI IORIO, L.; PAONE, F. M.; PALLONE, F.; MONTELEONE, G. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* B21060 suppresses human T-cell proliferation. **Infection and immunity**, v.75, n.4, p.1730-1737, 2007.

PEREIRA, G. V. M.; COELHO, B. O.; JÚNIOR, A. I. M.; THOMAZ-SOCCOL, V.; SOCCOL, C. R. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. **Biotechnology Advances**, v.36, n.8, p.2060-2076, 2018.

PRITTIE, J. Canine parvoviral enteritis: A review of diagnosis, management, and prevention. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.14, n.3, p.167–176, 2004.

ROOS, T. B.; DE LARA, A. P. S. S.; DUMMER, L. A.; FISCHER, G.; LEIVAS LEITE, F. P. The immune modulation of *Bacillus cereus* var. Toyoi in mice immunized with experimental inactivated Bovine Herpesvirus Type 5 vaccine. **Vaccine**, v.30, p.2173-2177, 2012.

ROOS, T. B.; MORAES, C. M.; STURBELLE, R. T.; DUMMER, L. A.; FISCHER, G.; LEIVAS LEITE, F. P. Probiotics *Bacillus toyonensis* and *Saccharomyces boulardii* improve the vaccine immune response to Bovine herpesvirus type 5 in sheep. **Research in Veterinary Science**, v.117, p.260-265, 2018.

ROSSI, G.; PENGO, G.; CALDIN, M.; PICCIONELLO, A. P.; STEINER, J. M.; COHEN, N. D.; JERGENS, A. E.; SUCHODOLSKI, J. S. Comparison of Microbiological, Histological, and Immunomodulatory Parameters in Response to Treatment with Either Combination Therapy with Prednisone and Metronidazole or Probiotic VSL#3 Strains in Dogs with Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. **PLOS ONE**, v.9, n.4, 2014.

RUSSELL, J. B.; DIEZ-GONZALEZ, F. The effects of fermentation acids on bacterial growth. **Advances Microbial Physiology**, v.39, p.205-234, 1998.

SAAD, Susana Marta Isay. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**; v.42, n.1, 2006.

SANDERS, Mary Ellen. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, v.61, p. 91-99, 2003.

SANTOS, F. D. S.; MENEGON, Y. A., PIRAINÉ, R. E. A.; RODRIGUES, P. R. C.; CUNHA, R. C.; LEIVAS LEITE, F. P. *Bacillus toyonensis* improves immune response in the mice vaccinated with recombinant antigen of bovine herpesvirus type 5. **Beneficial Microbes**, v.9, n.1, p.133-142, 2018.

SAUTER, S. N.; ALLENSPACH, K.; GASCHEN, F.; GRONE, A.; ONTSOUKA, E.; BLUM, J. W. Cytokine expression in an *ex vivo* culture system of duodenal samples from dogs with chronic enteropathies: modulation by probiotic bacteria. **Domestic Animal Endocrinology**, v.29, p.605-622, 2005.

SAUTER, S. N.; BENYACOUB, J.; ALLENSPACH, K.; GASCHEN, F.; ONTSOUKA, E.; REUTELER, G.; CAVADINI, C.; KNORR, R.; BLUM, J. W. Effects of probiotic bacteria in dogs with food responsive diarrhea treated with an elimination diet. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.90, p.269-277, 2006.

SCHACHTSIEK, M.; HAMMES, W. P.; HERTEL, C. Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001T surface protein CPF mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. **Applied Environment Microbiology**, v.70, p.7078-7085, 2004.

SCHMITZ, S.; HENRICH, M.; NEIGER, R.; WERLING, D.; ALLENSPACH, K. Comparison of TNF α responses induced by Toll-like receptor ligands and probiotic *Enterococcus faecium* in whole blood and peripheral blood mononuclear cells of healthy dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.153, p. 170-174, 2013.

SCHMITZ, S.; SUCHODOLSKI, J. Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre- and synbiotics – what is the evidence? **Veterinary Medicine and Science**, v.2, p.71-94, 2016.

SOLIMAN, A. H. S.; SHAROBA, A. M.; BAHLOL, H. E. M.; SOLIMAN, A. S.; RADI, O. M. M. Evaluation of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* for probiotic characteristics. **Middle East Journal of Applied Sciences**, v.5, n.1, p.10-18, 2015.

STROMPFOVÁ, V.; KUBAŠOVÁ, I.; LAUKOVÁ, A. Health benefits observed after probiotic *Lactobacillus fermentum* CCM 7421 application in dogs **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.101, p.6309-6319, 2017.

THE WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION. Diretrizes para a vacinação de cães e gatos. **Journal of Small Animal Practice**, v.57, p.1-50, 2016.

THOMAS, C. M.; VERSALOVIC, J. Probiotics-host communication: modulation of signaling pathways in the intestine. **Gut microbes**, v.1, n.3, p.148-163, 2010.

THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. 677p.

VÉLEZ, M. P.; VERHOEVEN, T. L. A.; DRAING, C.; VON AULOCK, S.; PFITZENMAIER, M.; GEYER, A.; LAMBRICHTS, I.; GRANGETTE, C.; POT, B.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Functional analysis of D-alanylation of lipoteichoic acid in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.11, p.3595-3604, 2007.

VERGIN, F. Anti-und Probiotica. **Hipokrates**, v.25, p.116-119, 1954.

VON DEHN, B. Pediatric Clinical Pathology. **Veterinary Clinics Small Animal**, v. 44, p.205-219, 2014.

WILLIAMS, L. D.; BURDOCK, G. A.; JIMÉNEZ, G.; CASTILLO, M. Literature review on the safety of Toyocerin®, a non-toxicogenic and non-pathogenic *Bacillus cereus* var. toyoi preparation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v.55, p.236-246, 2009.

WYNN, Susan G. Probiotics in veterinary practice. **Journal of the American Veterinary Medicine**, v.234, n.5, p.606-613, 2009.

YOUSTEN, Allan. *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnological Processes**, v.3, p.315-343, 1984.

Anexo



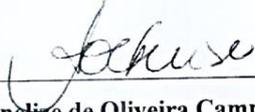
Pelotas, 20 de outubro de 2017

Certificado

Certificamos que a solicitação de adendo (inclusão de espécie animal) à proposta intitulada “Avaliação do efeito imunomodulador de *Bacillus toyonensis*, *Saccharomyces boulardii* e *Lactobacillus* sp. em cães” registro CEEA 3246-2017, de 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 complementação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 02/10/2017.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	01/05/2017 a 04/03/2019
Espécie/linhagem/raça	Canina/ Australian Cattle Dog e Labrador Retriever
Nº de animais	30
Idade	45 dias
Sexo	Fêmeas e Machos
Origem	Canis particulares da cidade de Pelotas/RS

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


 M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Assinatura do Professor Responsável:  Ciente em: 30 / 10 / 2017