

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

Utilização de esporos de *Bacillus toyonensis* como adjuvante de vacina recombinante de subunidade contra Herpesvírus Bovino tipo 5

Lucas Reichert Maubrigades

Pelotas, 2021

Lucas Reichert Maubrigades

**Utilização de esporos de *Bacillus toyonensis* como adjuvante de vacina
recombinante de subunidade contra Herpesvírus Bovino tipo 5**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do Conhecimento: Biotecnologia).

Orientador: Fábio Pereira Leivas Leite

Coorientador: Francisco Denis Souza Santos

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M447u Maubrigades, Lucas Reichert

Utilização de esporos de *Bacillus toyonensis* como adjuvante de vacina recombinante de subunidade contra Herpesvírus Bovino tipo 5 / Lucas Reichert Maubrigades ; Fábio Pereira Leivas Leite, orientador ; Francisco Denis Souza Santos, coorientador. — Pelotas, 2021.

96 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Bacillus. 2. Imunomodulação. 3. Alumen. 4. Anticorpos. 5. Citocinas. I. Leite, Fábio Pereira Leivas, orient. II. Santos, Francisco Denis Souza, coorient. III. Título.

CDD : 615.372

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alan John McBride (Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico)

Prof. Dr^a. Daniela Isabel Brayer Pereira (Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia)

Prof. Dr. Fabrício Rochedo Conceição (Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico)

Dr. Francisco Denis Souza Santos (Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia)

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (Orientador, Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico)

Para minha família, com todo carinho e gratidão
Dedico.

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida e por me dar todas as condições de ir em busca dos meus objetivos.

A toda minha família, pelo amor incondicional, carinho, atenção, incentivo e por vibrarem a cada passo meu.

A todos os meus amigos de longa data que estiveram sempre presentes e àqueles que construí dentro do curso de Bacharelado em Biotecnologia e do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

A minha namorada, Mariana Santos, pelo carinho e motivação nos momentos difíceis e a sua família pelo acolhimento e atenção.

Ao professor Dr. Fábio Leivas Leite pela orientação neste trabalho e pela ajuda e companheirismo durante todos esses anos de trabalho.

Ao meu coorientador Francisco Denis, pela amizade e companheirismo durante todos os anos de trabalho no laboratório, estando sempre pronto para auxiliar durante os experimentos.

Aos amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Microbiologia, que fazem/fizeram parte do nosso grupo de pesquisa e a equipe do Laboratório XI pela ajuda e apoio durante os experimentos.

À equipe do Biotério Central da UFPel pela ajuda durante a realização do experimento com os animais.

Ao Laboratório de Virologia Veterinária da UFPel pelo auxílio nas análises.

À UFPel e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, que ao longo do tempo me proporcionou extremo conhecimento e amadurecimento como pessoa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

“A vida é uma ciência que, ainda a própria ciência não a explica”.

Jorge Luiz dos Santos Júnior

Resumo

MAUBRIGADES, Lucas Reichert. **Utilização de esporos de *Bacillus toyonensis* como adjuvante de vacina recombinante de subunidade contra Herpesvírus Bovino tipo 5**. 2021. 96f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Adjuvantes vacinais são compostos que potencializam a resposta imune. Esporos de bactérias do gênero *Bacillus* são capazes de potencializar a resposta imune de vacinas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito adjuvante de esporos de *Bacillus toyonensis* em uma vacina experimental, bem como realizar uma revisão sistemática de estudos que utilizaram esporos de bactérias do gênero *Bacillus* como adjuvantes de diferentes vacinas testadas em modelo animal. Esporos de *Bacillus toyonensis*, vivos e inativados, foram utilizados em uma vacina contendo a glicoproteína D recombinante (rgD) de Herpesvírus Bovino tipo 5 (BoHV-5). Seis grupos experimentais de camundongos foram vacinados por via subcutânea no dia 0 e receberam um reforço no dia 21 do experimento, com as seguintes formulações vacinais: rgD (40 µg) + esporos vivos (2×10^9 UFC); rgD + esporos mortos (2×10^9 UFC); rgD + esporos vivos + alumen (2 mg); rgD + esporos mortos + alumen; rgD + alumen e rgD + PBS. Foram observados níveis significativos ($p < 0,05$) de anticorpos IgG totais de até 7.5 vezes superiores no grupo que recebeu esporos vivos associados a rgD e adsorvidos ao alumen e 12 vezes superiores no grupo que recebeu esporos inativados associados a rgD e adsorvidos ao alumen, quando comparados ao grupo rgD + alumen (controle). Foram detectados níveis significantes de IgG1 de ~8 vezes, IgG2a de ~16 vezes e IgG2b de ~8 vezes superiores ($p < 0,05$), nos camundongos que receberam esporos vivos ou inativados adsorvidos ao alumen na formulação da vacina, quando comparados ao grupo rgD + alumen. Os grupos de animais que receberam esporos vivos ou inativados adsorvidos ao alumen também apresentaram níveis de anticorpos neutralizantes contra o BoHV-5 e níveis significativos de transcrição de mRNA de *IFN-γ* de até 66 vezes, *IL17* de 14 vezes e *IL12* de 2.8 vezes superiores ($p < 0,05$), quando comparados ao grupo rgD + alumen. Estudos encontrados na revisão sistemática também mostraram que a vacinação com as formulações contendo esporos de *B. subtilis*, *B. toyonensis* e *B. atrophaeus* induziu o desenvolvimento de uma resposta imune humoral e celular nos animais, com significativa produção de anticorpos e expressão de citocinas, além da estimulação e proliferação de células imunes. Em conclusão, nossos dados demonstraram que os esporos de bactérias do gênero *Bacillus* possuem propriedades imunomoduladoras e são capazes de melhorar a resposta de vacinas, se destacando como componentes promissores a serem utilizados como adjuvantes em formulações vacinais.

Palavras-chave: *Bacillus*, Imunomodulação, Alumen, Anticorpos, Citocinas.

Abstract

MAUBRIGADES, Lucas Reichert. **Utilization of *Bacillus toyonensis* spores as adjuvant of a recombinant subunit vaccine against Bovine Herpesvirus type 5.** 2021. 96f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Vaccinal adjuvants are compounds that potentiate the immune response. Bacterial spores of the *Bacillus* genus are able to enhance the immune response when used in vaccines. The aim of this work was to evaluate the use of *Bacillus toyonensis* spores as an adjuvant to an experimental vaccine as well as conducting a systematic review of studies that used *Bacillus* spores as adjuvants to different vaccines tested in animal model. Live and heat-killed *Bacillus toyonensis* spores were used in a vaccine containing the recombinant glycoprotein D (rgD) of Bovine Herpesvirus type 5 (BoHV-5). Six experimental groups of mice were vaccinated subcutaneously on day 0 and boosted on day 21 of the experiment, with the following vaccine formulations: rgD (40 µg) + live spores (2×10^9 CFU); rgD + inactivated spores (2×10^9 UFC); rgD + live spores + alum (2 mg); rgD + inactivated spores + alum; rgD + alum and rgD + PBS. Significant levels ($p < 0.05$) of total IgG antibodies were observed up to 7.5 times higher in the group that received live spores associated with rgD and adsorbed to alum and 12 times higher in the group that received inactivated spores associated with rgD and adsorbed to alum, when compared to the rgD + alum (control) group. Significant levels of IgG1 of ~8-fold, IgG2a of ~16-fold and IgG2b of ~8-fold ($p < 0.05$) were detected in mice that received live or inactivated spores adsorbed to alum in the vaccine formulation, when compared to the rgD + alum group. Groups of animals that received live or inactivated spores adsorbed to alum also presented levels of neutralizing antibodies against BoHV-5 and significant levels of *IFN-γ* mRNA transcription up to 66-fold, *IL17* of 14-fold and *IL12* of 2.8-fold ($p < 0.05$), when compared to the rgD + alum group. Studies found in the systematic review also showed that vaccination with formulations containing spores of *B. subtilis*, *B. toyonensis*, and *B. atrophaeus* induced the development of a humoral and cellular immune response in the animals, with significant production of antibodies and expression of cytokines, in addition to stimulation and proliferation of immune cells. In conclusion, our data demonstrated that the *Bacillus* spores have immunomodulatory properties and are capable of improving the response of vaccines, standing out as promising components to be used as adjuvants in vaccine formulations.

Keywords: *Bacillus*, Immunomodulation, Alum, Antibodies, Cytokines.

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Resposta imune	13
2.2 Adjuvantes	16
2.3 Gênero <i>Bacillus</i>	19
2.3.1 <i>Bacillus toyonensis</i>	21
2.4 Esporos de <i>Bacillus</i> spp. e seu potencial adjuvante	22
2.5 Herpesvírus bovino	25
2.5.1 Herpesvírus bovino tipo 5	25
2.5.2 Resposta imune à infecção contra o herpesvírus bovino tipo 1 e 5	27
2.5.3 Vacinação contra herpesvírus bovino tipo 5	27
2.5.4 Glicoproteína D de herpesvírus bovino tipo 5	29
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	31
3.1 Hipótese.....	31
3.2 Objetivo Geral	31
3.3 Objetivos Específicos.....	31
4 CAPÍTULOS	32
4.1 Manuscrito 1 – <i>Bacillus</i> spores as vaccinal adjuvants – a systematic review ..	32
4.2 Artigo 1 – Association of <i>Bacillus toyonensis</i> spores with alum improves bovine herpesvirus 5 subunit vaccine immune response in mice	55
5 DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS	78
6 CONCLUSÃO GERAL.....	82
7 REFERÊNCIAS.....	83
8 ANEXOS	95
Anexo A – Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal.....	95

1 INTRODUÇÃO GERAL

O uso de vacinas é a alternativa mais eficaz na profilaxia e no controle de doenças infecciosas (Greenwood, 2014). As vacinas convencionais, baseadas na utilização de patógenos atenuados ou inativados, apresentam limitações relacionadas à segurança e estabilidade (D'Amico et al., 2021). Vacinas baseadas em antígenos recombinantes surgem como alternativa em comparação às convencionais, ao passo que são consideradas relativamente mais seguras devido aos seus reduzidos efeitos adversos, incluindo irritações locais e o risco de reversão a virulência (Shah et al., 2017). No entanto, as vacinas de subunidades recombinantes são geralmente pouco imunogênicas e requerem componentes adicionais para estimular uma resposta imune eficaz (Schmidt et al., 2016).

Os adjuvantes são importantes componentes das vacinas, capazes de amplificar uma resposta imune induzida contra antígenos, estimulando uma resposta protetora eficiente no hospedeiro (Lee & Nguyen, 2015). O hidróxido de alumínio (alumen) foi um dos primeiros adjuvantes a ser licenciado e é amplamente utilizado em vacinas para humanos e animais em todo o mundo (Colaprico et al., 2020). Os mecanismos de ação do alumen são multifatoriais e ainda precisam ser melhor elucidados, mas sabe-se que ele permanece no local da injeção e libera lentamente o antígeno ao longo do tempo para ser reconhecido pelas células apresentadoras de antígeno (APCs), além de ativar a via de inflamassoma NLRP3 e induzir a liberação de moléculas sinalizadoras denominadas de padrões moleculares associados ao dano celular (DAMPs), amplificando assim a resposta imune vacinal (Ghimire et al., 2012; Oleszycka & Lavelle, 2014).

Devido a necessidade constante de novos adjuvantes, algumas moléculas de origem bacteriana têm sido avaliadas devido a suas propriedades imunomoduladoras para utilização como adjuvantes em vacinas. Entre estas moléculas se destacam os esporos de bactérias do gênero *Bacillus* (Barnes et al., 2007; Giesker & Hensel, 2014). Os esporos são capazes de ativar os receptores *Toll-like* (TLR) expressos em células dendríticas (DCs) e modular a resposta imune humoral e celular no hospedeiro (De Souza et al., 2014).

Bacillus toyonensis é uma bactéria Gram positiva, formadora de esporos, não patogênica, que não produz enterotoxinas (Jiménez, Blanch, et al., 2013). Esse

microrganismo é utilizado há várias décadas como probiótico na alimentação animal, melhorando a eficiência alimentar e provendo benefícios a saúde dos animais (Gil-Turnes et al., 2007). Esporos de *Bacillus toyonensis* e de outras espécies do gênero *Bacillus*, por apresentarem propriedades imunomoduladoras, vêm sendo estudados como adjuvantes em diversas vacinas experimentais veterinárias e humanas (Aps et al., 2015; Oliveira-Nascimento et al., 2012; Roos et al., 2012; De Souza et al., 2014; Maubrigades et al., 2020; Santos et al., 2021).

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é o agente causador da meningoencefalite que acomete bovinos jovens, com mortalidade de 100% na maioria das ocorrências (Rissi et al., 2007). Esta doença é responsável por perdas econômicas, principalmente em países da América do Sul, como Brasil e Argentina (Carrillo et al., 1983; Salvador et al., 1998; Gabriela Riet-Correa et al., 2006). Vacinas recombinantes contra os herpesvírus são baseadas nas principais glicoproteínas do envelope viral (Babiuk et al., 1996). A glicoproteína D de herpesvírus bovino tipo 5 é essencial para a ligação e penetração do vírus nas células permissivas e é um dos principais alvos da resposta imune do hospedeiro, induzindo uma forte resposta imune humoral e celular durante a infecção (Alves Dummer et al., 2014). Estudos anteriores demonstraram que a glicoproteína D recombinante de BoHV-5 (rgD), quando utilizada como antígeno vacinal e associada a citocina IL17 recombinante ou a adjuvantes oleosos, foi capaz de induzir altos níveis de anticorpos neutralizantes em camundongos e bovinos (Dummer et al., 2014; Araujo et al., 2018; Gonçalves et al., 2021).

A busca por novos adjuvantes vem se tornando cada vez maior e é um processo chave para a produção de vacinas que tenham alta eficácia contra os patógenos causadores de doenças (Lee & Nguyen, 2015). Nesse sentido, o estudo de algumas espécies de bactérias do gênero *Bacillus* se faz importante, visto que esporos desses microrganismos foram capazes de modular a resposta imune e aumentar a imunogenicidade de vacinas (Roos et al., 2012; De Souza et al., 2014; Santos et al., 2018). Portanto, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito adjuvante de esporos, vivos e inativados, de *Bacillus toyonensis* associados ao alumen em uma vacina contendo a glicoproteína D recombinante de BoHV-5 em modelo murino.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Resposta imune

A resposta imune pode ser organizada com base em duas classificações principais, a resposta imune inata e resposta imune adaptativa. A imunidade inata é considerada a primeira linha de defesa do organismo contra infecções. É representada por barreiras físicas, químicas, biológicas e células especializadas, presentes em todos os indivíduos, independentemente de contato prévio com algum patógeno ou imunógeno (Turvey & Broide, 2010). A resposta imune inata tem primordial importância no reconhecimento e eliminação de microrganismos invasores, já que nosso organismo está constantemente exposto a patógenos presentes no ambiente. As principais vias de entrada desses agentes são o tecido epitelial e as superfícies mucosas, que possuem mecanismos especializados para proteção contra a invasão desses patógenos aos tecidos (Turvey & Broide, 2010). Os mecanismos de defesa inata incluem a secreção de enzimas e peptídeos antimicrobianos, que têm papel fundamental na prevenção da adesão do patógeno ao epitélio e mucosas do organismo (Pasupuleti et al., 2012).

As principais células envolvidas na resposta imune inata são neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, macrófagos, células linfoides inatas (ILCs) e células dendríticas (DCs). As DCs estão numa fase intermediária e representam um elo crucial entre o sistema imune inato e adaptativo, por meio do reconhecimento de patógenos pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), internalização e processamento do antígeno, seguido de apresentação de seus peptídeos para os linfócitos T auxiliares (Black et al., 2010). Algumas classes de PRRs já foram descritos, como o receptor *Toll* (TLRs), receptor gene-indutível por ácido retinoico (RLRs), receptor de domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo (NLRs) e os receptores de lectina do tipo C (CLRs) (Myiaji et al., 2011). Com principal destaque no reconhecimento de moléculas microbianas e na sinalização e direcionamento das respostas inatas, encontram-se os TLRs que reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) presentes nos microrganismos invasores, desencadeando o início da resposta imune inata (Kawai & Akira, 2011). Os TLRs são altamente conservados entre os mamíferos e são expressos em DCs e macrófagos, podendo atuar como receptores na superfície celular ou intracelularmente (Myiaji et al., 2011). Receptores como o TLR4 e TLR2 estão localizados na superfície celular de

células apresentadoras de antígenos (APCs) e são capazes de reconhecer componentes lipídicos da membrana de patógenos, como lipoproteínas e lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) (Iwasaki & Medzhitov, 2010). Os receptores intracelulares, que incluem os TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 e TLR13, são capazes de reconhecer ácidos nucleicos derivados de vírus e bactérias (Kawasaki & Kawai, 2014). Os TLRs, após o reconhecimento de PAMPs, ativam uma cascata de sinalização principalmente através de moléculas adaptadoras como o fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88), levando a ativação de quinases e fatores de transcrição e culminando na maturação das células dendríticas (Rueckert & Guzmán, 2012). Esse evento vai possibilitar a posterior interação dessas células com os linfócitos T via complexo principal de histocompatibilidade tipo I (MHC I) e complexo principal de histocompatibilidade tipo II (MHC II) para dar início à resposta imune adaptativa (Iwasaki & Medzhitov, 2004).

Outro importante grupo de células do sistema imune inato são as células linfoides inatas (ILCs). As ILCs são uma família de linfócitos que têm funções importantes na indução de inflamação, defesa do hospedeiro e reparo de tecidos (Crome & Ohashi, 2018). Essas células não apresentem receptores específicos para o antígeno como os linfócitos T e B, e detectam mudanças no microambiente por meio de uma ampla gama de receptores para citocinas e receptores para componentes de alguns nutrientes e produtos microbianos (Panda & Colonna, 2019). Encontradas em tecidos linfoides e não linfoides, as ILCs são células que residem principalmente nos tecidos e são particularmente abundantes nas superfícies da mucosa do intestino e pulmão (Mjosberg & Spits, 2016). Elas são classificadas com base nas principais citocinas que produzem, sendo divididas em três grupos principais: ILC1s, ILC2s e ILC3s. Dois tipos adicionais de células imunes, as células *Natural Killer* (NK) e células indutoras de tecido linfóide (LTi) se encaixam nos grupos de ILCs1 e ILCs3, respectivamente, embora tenham vias distintas de desenvolvimento (Vivier et al., 2018). As ILCs1 têm função principal na proteção contra patógenos intracelulares como vírus e bactérias, células cancerígenas e produzem principalmente interferon γ (IFN- γ) (Panda & Colonna, 2019). As ILCs2 são importantes em respostas alérgicas e anti-helmínticas, produzindo citocinas como interleucina (IL) 4, IL5, IL9 e IL13, além de auxiliar no reparo de tecidos por meio da secreção de anfiregulina (Monticelli et al., 2015). As ILCs3 secretam principalmente IL22 e IL17, sendo importantes no reparo

de tecidos e homeostase de células epiteliais do intestino, bem como na proteção contra bactérias extracelulares e fungos (Penny, Hodge & Hepworth, 2018).

Quando as defesas inatas do hospedeiro são evadidas, é necessária a ativação da resposta imune adaptativa. A resposta imune adaptativa é mediada pelos linfócitos T e B e é desencadeada a partir da ativação e maturação das DCs, as quais se tornam capacitadas a apresentar peptídeos antigênicos para os linfócitos T virgem e assim fornecem os sinais estimuladores necessários para o desenvolvimento de suas funções efetoras (Lambrecht et al., 2009). Os linfócitos T ativam os linfócitos B e induzem sua proliferação e diferenciação em células de memória e células plasmáticas secretoras de anticorpos, além de auxiliarem no processo de maturação de afinidade e na troca de isotipo de imunoglobulinas (den Haan et al., 2014). A ativação dos linfócitos T pelas DCs requer três sinais: o reconhecimento do antígeno pelo seu receptor de superfície, a estimulação da expressão de moléculas coestimuladoras e a produção de citocinas (Curtsinger & Mescher, 2010).

As citocinas são pequenas proteínas produzidas e secretadas pelas células do sistema imune que tem efeitos locais e sistêmicos determinantes para o desenvolvimento e a regulação da resposta imune inata e adaptativa (Gulati et al., 2016). As citocinas influenciam na diferenciação das subpopulações de linfócitos T auxiliares em Th1, Th2, Th17 ou Treg (Murphy & Reiner, 2002). Os linfócitos Th1 atuam, em geral, na resposta imune contra microrganismos intracelulares. A resposta é iniciada com macrófagos e DCs que são ativados e secretam IL12, estimulando a produção de grandes quantidades de IFN- γ e promovendo a diferenciação de linfócitos T virgens em linfócitos Th1 (Shaw et al., 2018). O IFN- γ também interage com linfócitos B e promove a produção de anticorpos e a mudança de isotipos com propriedades opsonizantes (Wan & Flavell, 2009). Já a resposta do tipo Th2 é mediada principalmente pela IL4, que atua nos linfócitos B estimulando a produção de IgE e também pela IL5, que ativa eosinófilos e mastócitos (Paul et al., 2010). Os linfócitos Th17 secretam a IL17 e recrutam neutrófilos para os locais de infecção. Além disso, estimulam a proliferação de linfócitos B, bem como a mudança de isotipos para IgG2a e IgG3 (Mitsdoerffer et al., 2010). Em geral, a resposta do tipo Th17 induz inflamação neutrofílica que controla infecções por fungos e bactérias extracelulares e também intracelulares (Ouyang et al., 2008; Li et al., 2018). Os linfócitos Treg produzem citocinas imunossupressoras como IL10 e o fator transformador de crescimento β (TGF- β) e tem como função manter a homeostase e tolerância imunológica,

bloqueando a ativação de algumas células como linfócitos e macrófagos, inibindo a produção de IL12 (Wan & Flavell, 2009; Romano et al., 2019).

2.2 Adjuvantes

A palavra adjuvante deriva do latim “adjuvare”, que significa “ajudar”, sendo assim, os adjuvantes são compostos capazes de estimular o sistema imune, potencializando o efeito imunogênico de um determinado antígeno coadministrado ou modulando a resposta imunológica naturalmente induzida contra esse antígeno (Krieg, 2007). Tais compostos representam um componente importante de diversas vacinas convencionais e de nova geração pois aumentam a imunogenicidade de antígenos, tornando a escolha de um determinado adjuvante essencial para aumentar a eficácia de vacinas e aumentar a proteção efetiva contra variados patógenos (Lambrecht et al., 2009).

Os adjuvantes como componentes de vacinas são capazes de reduzir a quantidade de antígeno utilizado, a quantidade de doses necessárias para induzir uma resposta eficiente contra o antígeno no hospedeiro, aumentar a duração da proteção e a imunogenicidade de antígenos recombinantes altamente purificados (Reed et al., 2013; Shah et al., 2017). Atualmente, uma extensa família de moléculas como sais minerais, produtos microbianos, emulsões, saponinas, citocinas, polímeros, micro e nanopartículas e lipossomas, têm sido analisadas através de estudos *in vitro* e *in vivo* quanto a sua capacidade adjuvante. Para a aprovação do seu uso, os adjuvantes devem ser compostos inertes, estáveis, que não causem reações adversas, com uma vida útil longa e baixo custo de produção (Heegaard et al., 2011).

Os sais de alumínio, emulsões oleosas em água e virossomos são licenciados para o uso em humanos e animais e aprovadas para utilização em algumas formulações vacinais (Montomoli et al., 2011). Além desses, agonistas de receptores TLR estão sendo testados em vacinas, com destaque para o monofosforil lipídeo A (MPL), derivado de lipopolissacarídeo (LPS) da bactéria *Salmonella* Enterica serovar *minnesota* e agonista de receptores TLR4, que já foi licenciado para o uso nos Estados Unidos e na Europa em vacinas contra o Papilomavírus Humano (HPV) e o vírus da Hepatite B (HBV) (Awate et al., 2013; De Gregorio et al., 2013).

A principal classificação dos adjuvantes é baseada no modo com o qual esses compostos ou moléculas interagem com o sistema imune. Eles podem ser

classificados como sistema de entrega de antígenos, considerados de primeira geração, tendo como exemplos lipossomos, sais de alumínio, emulsões e micropartículas. A segunda geração de adjuvantes é classificada como imunopotenciadores ou imunoestimulantes e são incluídos neste grupo as citocinas e agonistas de TLR (Apostólico et al., 2016).

Os sistemas de entrega de antígenos compreendem moléculas como os lipossomos, virossomos e emulsões oleosas e recebem essa nomenclatura por apresentarem os antígenos diretamente para as células do sistema imune inato, como DCs e macrófagos. Eles otimizam a apresentação e exposição de antígenos ao sistema imune por meio da liberação controlada e gradativa do antígeno, evitando sua rápida degradação (Leroux-Roels, 2010). Emulsões em água, como MF59 e AS03, são baseadas no composto químico esqualeno e são licenciados para uso na Europa em vacinas contra Influenza desde 2009 (Clark et al., 2009). São capazes de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias e melhorar a apresentação do antígeno para APCs (Burakova et al., 2018).

Os virossomos são estruturas víricas desprovidas de material genético que são utilizados em vacinas contra Hepatite A e Influenza tipo A e B (Rambe et al., 2015) e interagem diretamente com linfócitos B e DCs, que ativam linfócitos T via complexo principal de histocompatibilidade tipo II (MHC II) e aumentam a produção de citocinas como IL2, IFN- γ e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Cusi, 2006). Lipossomas são partículas esféricas formadas por uma bicamada lipídica capazes de encapsular o antígeno e otimizar seu reconhecimento pelas células do sistema imune inato, porém são mais eficientes se associadas a moléculas coestimuladoras ou a outros adjuvantes, como a saponina (Montomoli et al., 2011; Shah et al., 2017).

Um dos principais exemplos de adjuvantes que agem como sistema de entrega são os sais de alumínio, que são encontrados na forma de fosfato de alumínio, hidróxido de alumínio, ou hidróxido-fosfato de alumínio. O hidróxido de alumínio (alumen) foi descoberto em 1926 e tem sido utilizado como adjuvante com sucesso em vacinas licenciadas humanas e veterinárias há mais de 80 anos (Glenny et al., 1926; Shah et al., 2017). Primeiramente, seu efeito adjuvante principal foi proposto por Glenny em 1931 como um depósito no sítio de inoculação, que libera lentamente o antígeno para reconhecimento pelo sistema imune (Glenny et al., 1931; Brito & O'Hagan, 2014), porém, foi demonstrado que esse efeito não é fundamental para a adjuvantividade do alumen (Hutchinson et al., 2012). Há evidências que mostram que

o efeito adjuvante do alumen está relacionado com sua interação principalmente com lipídios da superfície de DCs, induzindo algumas vias de sinalização como a fosfoinositídeo 3-quinase (PI3-quinase) e tirosina-proteína quinase (*Syk*), reduzindo a degradação do antígeno e prolongando a resposta imune (Flach et al., 2011; Ghimire et al., 2012). Sabe-se que esses adjuvantes também estimulam células do sistema imune inato através da via de ativação do inflamassoma NLRP3, promovendo a diferenciação de linfócitos T virgem em linfócitos Th2 e estimulando a secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como as IL4 e IL5 (Apostólico et al., 2016). Além disso, o alumen induz o dano tecidual e/ou morte celular após a injeção, promovendo a liberação de DAMPs, moléculas sinalizadoras que podem, subsequentemente, induzir inflamação a partir do seu reconhecimento (Oleszycka & Lavelle, 2014). Dessa forma, esse adjuvante melhora a apresentação do antígeno para macrófagos e DCs e auxilia no recrutamento de células de defesa para os sítios de infecção, por meio de mecanismos de ação que parecem ser multifatoriais e que ainda não são totalmente esclarecidos (Awate et al., 2013; Pashine et al., 2005).

Os adjuvantes imunopotenciadores estimulam o sistema imune por meio de PRRs, interagindo com receptores do tipo TLR, RLR ou NLR (Apostólico et al., 2016). Esses receptores estão presentes em células como macrófagos, monócitos, DCs e neutrófilos e tem papel fundamental no reconhecimento de moléculas microbianas (Iwasaki & Medzhitov, 2010), possibilitando a ativação e maturação de macrófagos e DCs e seu recrutamento para o sítio de infecção, aumentando a produção de citocinas, como as IL1 e 12 e TNF- α , e os níveis de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 e CD88) e de moléculas de MHC classe I e/ou II, necessárias para ativação dos linfócitos T (Mbow et al., 2010; Montomoli et al., 2011). O grupo dos adjuvantes imunopotenciadores compreende moléculas como as saponinas, citocinas e os agonistas de TLR. As saponinas são glicosídeos esteroides ou triterpenoides encontrados em algumas plantas, capazes de melhorar a apresentação e processamento de antígenos para células do sistema imune, como DCs e macrófagos, aumentando a produção de citocinas como IFN- γ e IL12 e induzindo uma forte resposta imune celular (Rajput et al., 2007). O uso de citocinas como adjuvantes tem sido adotado frequentemente em vacinas veterinárias (Fan et al., 2016; Kotla et al., 2016). O uso de IFN- γ como adjuvante em vacina contra peste suína estimulou a produção de anticorpos e a expressão de moléculas de MHC I e II (Fan et al., 2016). Em aves, a incorporação de IL18 na vacina contra a doença de Newcastle estimulou

ambas respostas imune celular e humoral, com proliferação de linfócitos T e B (Hung et al., 2010).

Os agonistas de TLR compreendem uma ampla gama de moléculas, como dinucleotídeos de citosina fosfoguanosina (CpG-ODN) e o MPL, que possuem propriedades baseadas na interação com a via de sinalização TLR e são frequentemente utilizadas em associação com outros adjuvantes. O MPL é capaz de estimular DCs e macrófagos a produzirem citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL12 (Montomoli et al., 2011). Além disso, agonistas de TLR-9, como o CpG-ODN e de TLR-7 e TLR-8, como os compostos imiquimode e resiquimode, vêm sendo avaliados por meio de testes *in vivo* e ensaios clínicos (Bhardwaj et al., 2010). Agonistas de TLR-7/8 quando utilizados em uma vacina antitumoral promoveram um aumento na ativação e expansão de DCs e na resposta de linfócitos T citotóxicos, o que resultou em uma maior eficácia do tratamento antitumoral em modelos tumorais de melanoma, câncer renal e câncer de bexiga, com redução significativa de metástase (Kim et al., 2018).

Atualmente, a busca por novos adjuvantes vem se mostrando extremamente necessária devido à baixa imunogenicidade de certos antígenos, principalmente os recombinantes, e a pouca quantidade de adjuvantes licenciados para o uso em vacinas (Lee & Nguyen, 2015). A identificação desses novos compostos e seu uso na formulação de novas vacinas tem o intuito de estimular no hospedeiro tanto uma resposta inicial por meio dos PRRs como uma resposta imune adaptativa induzida por linfócitos T, produzindo anticorpos e estimulando o desenvolvimento de mecanismos efetores que sejam capazes de proteger e/ou combater as infecções por patógenos, como vírus, bactérias e fungos (O'Hagan & De Gregorio, 2009).

2.3 Gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* é formado por bactérias Gram-positivas, em forma de bastonetes, formadoras de esporos, aeróbias obrigatórias ou anaeróbias facultativas e que estão presentes na natureza, podendo ser comumente isolados de fontes como o solo, água e ar (Alou et al., 2015). Microrganismos do gênero *Bacillus* compreendem espécies não patogênicas como também espécies que são patógenos oportunistas ou produtores de toxinas, oferecendo risco de infecção e intoxicação para seres humanos e animais, como *Bacillus anthracis* e *Bacillus cereus* (Elshaghabe et al.,

2017). Diversas espécies de *Bacillus* são utilizados na indústria há mais de 50 anos como probióticos na alimentação humana e animal, em formulações de suplementação alimentar e produtos fermentados, como *B. subtilis*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. toyonensis* e *B. licheniformis*, além de terem importância na área médica e no controle de pragas e insetos, como o *B. thuringiensis* (Cutting, 2011).

Esporos são estruturas metabolicamente quiescentes e extremamente resistentes, produzidas por algumas bactérias em resposta a condições ambientais adversas (Huang et al., 2008). Devido a sua alta estabilidade, os esporos podem sobreviver neste estado de dormência por longos períodos, resistindo a altas temperaturas, radiação ultravioleta, desidratação e escassez de nutrientes (Nicholson et al., 2000). Além disso, os esporos resistem às condições do trato gastrointestinal e ao processamento e estocagem e de alimentos, características fundamentais que permitem a sua vasta utilização como probióticos (Elshagabee et al., 2017).

O processo de esporulação é um processo de diferenciação celular que ocorre quando existe escassez de nutrientes para a célula. Inicia com a duplicação do cromossomo celular formando uma estrutura denominada de filamento axial, que dá início ao processo de formação do esporo. Em seguida, a célula é dividida de forma assimétrica, por meio de uma cascata ativada por fatores sigma, formando dois compartimentos diferentes dentro da célula, a célula mãe e o pré-esporo. A camada de peptideoglicano é degradada e então o pré-esporo é engulfado pela célula mãe, formando uma estrutura de membrana dupla. Depois disso, ocorre a formação do córtex e síntese e deposição de proteínas que formarão a capa do esporo. Após 8 a 10 horas, o esporo maduro pode ser liberado para o ambiente por meio da lise da célula mãe e, quando na presença de nutrientes e condições apropriadas, será capaz de germinar novamente e originar uma célula vegetativa (McKenney et al., 2013; Tan & Ramamurthi, 2014).

O esporo é formado por estruturas como a capa, as membranas interna e externa, córtex, parede celular germinativa e nucleóide (Tan & Ramamurthi, 2014). Algumas espécies do gênero *Bacillus* são capazes de produzir uma estrutura chamada exósporo, que circunda a capa do esporo, como *B. cereus*, sendo que em outras espécies ela é ausente, como é o caso de *B. subtilis* (Traag et al., 2010). A capa do esporo é formada por mais de 70 proteínas que são arranjadas ao seu redor dando origem a uma complexa estrutura, capaz de conferir proteção química e enzimática (McKenney et al., 2010). O córtex é composto de peptideoglicano e é

sintetizado entre as duas membranas interna e externa que circulam o nucleóide do esporo (Setlow, 1995; Meador-Parton & Popham, 2000). Essa estrutura é fundamental para manter o controle de entrada e saída de água, mantendo o estado de dormência do esporo e sua resistência às altas temperaturas (Vasudevan et al., 2007). Logo abaixo do córtex está localizada a parede celular germinativa, que formará a parede celular do esporo após sua germinação. O nucleóide do esporo contém o material genético, ribossomos e enzimas e grande quantidade de ácido dipicolínico, que atua na estabilização do DNA (Setlow et al., 2006).

2.3.1 *Bacillus toyonensis*

Bacillus toyonensis é uma bactéria Gram-positiva, não patogênica, formadora de esporos e que faz parte do grupo *B. cereus*, o qual compreende algumas espécies patogênicas e que habitam o solo (Jiménez, Blanch, et al., 2013). Este microrganismo foi isolado no ano de 1966 no Japão, primeiramente identificado como *B. cereus* var. *toyoi*, e posteriormente, foi proposto como uma nova espécie com o nome de *B. toyonensis*, através de um estudo taxonômico que comparou sequências do genoma e características fenotípicas do microrganismo com espécies do grupo *B. cereus* (Jiménez, Urdiain, et al., 2013). Os esporos de *B. toyonensis* são utilizados na alimentação animal há várias décadas na preparação do TOYOCERIN®, uma apresentação comercial usada como probiótico na alimentação de suínos, bovinos, aves e coelhos em vários países. Na Europa, o uso deste probiótico foi autorizado pela primeira vez no ano de 1994, se tornando o primeiro microrganismo utilizado como suplemento na alimentação animal na União Europeia (Williams et al., 2009).

A cepa BCT-7112^T de *B. toyonensis*, utilizada na formulação do TOYOCERIN®, foi avaliada anteriormente quanto a sua segurança em relação à transferência de genes de resistência a antibióticos e produção de enterotoxinas. Glenwright et al. (2017) identificaram que os genes de resistência aos antibióticos tetraciclina (*tetQ*) e cloranfenicol (*catQ*) presentes nessa cepa foram advindos de um ancestral comum e são intrínsecos a outros microrganismos do grupo *B. cereus*, além de não configurarem elementos genéticos móveis passíveis de transferência gênica horizontal, o que não representa um risco de transferência para humanos ou animais. Além disso, a capacidade da cepa de produzir enterotoxinas também foi avaliada recentemente (Abdulmawjood et al., 2019). Foi observado que os níveis proteicos e

de expressão de enterotoxinas foram ausentes ou muito baixos quando comparados a outras cepas pertencentes ao grupo *B. cereus*, indicando que sua habilidade para produzir enterotoxinas funcionais é consideravelmente baixa (Abdulmawjood et al., 2019).

2.4 Esporos de *Bacillus* spp. e seu potencial adjuvante

Sabe-se que esporos de bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, devido suas características de resistência e estabilidade, são utilizadas como probióticos já há várias décadas (Cutting, 2011). Além disso, por apresentarem propriedades imunomoduladoras, diversos trabalhos indicam a possibilidade de serem utilizados como adjuvantes em vacinas (Roos et al., 2012; De Souza et al., 2014; Santos et al., 2018). Esporos de *B. subtilis* são bastante explorados na literatura e já foram testados em diversas vacinas. Esporos desse microrganismo estimularam a produção de altos níveis de anticorpos em camundongos vacinados com o Toxoide tetânico. Além disso, induziram a produção de IgG1 e IgG2a, caracterizando uma resposta do tipo Th1/Th2 balanceada e quando administrados via intranasal, promoveram aumento na produção de IgA nos tecidos de mucosa (Barnes et al., 2007).

A coadministração de esporos de *B. subtilis* com a proteína recombinante p24 gag do vírus da imunodeficiência humana (HIV) promoveu um aumento nos níveis de anticorpos após a administração em camundongos pela via subcutânea, melhorando a imunogenicidade do antígeno (De Souza et al., 2014). No mesmo trabalho, os esporos também promoveram a ativação de APCs e aumento de expressão de moléculas MHC e CD40, seguidos de um aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas DCs dos camundongos. Além disso, foi constatado um papel direto da imunidade inata nas propriedades imunomoduladoras dos esporos, pois linhagens de camundongos *knockout* para os genes MyD88 e TLR2 apresentaram ausência de efeitos adjuvantes mediados pelos esporos (De Souza et al., 2014).

A utilização de esporos de *B. subtilis* como adjuvante de vacina de DNA também foi abordada por Aps et al. (2015). Um estudo *in vivo* foi realizado em camundongos vacinados pela via parenteral com um plasmídeo codificante para a proteína E7 do papilomavírus humano tipo 16, através da estimulação de DCs com diferentes concentrações do esporo. Os resultados demonstraram que os esporos de *B. subtilis* promoveram a ativação de DCs e induziram a migração de células pró-

inflamatórias, como neutrófilos e eosinófilos. Além disso, camundongos imunizados com a vacina que codifica a proteína E7 coadministrada aos esporos, tiveram maior ativação de linfócitos T CD8⁺ antígenos específicos (Aps et al., 2015).

Esporos de *B. subtilis* também foram testados como adjuvante em frangos vacinados com uma vacina contra o vírus da Influenza aviária H9N2 (Lee et al., 2020). Quando adicionados à formulação contendo o vírus inativado, os esporos foram capazes de induzir uma resposta imune humoral com aumento da produção de IgG, juntamente com o desenvolvimento de uma resposta imune celular com uma maior proliferação de linfócitos T citotóxicos e linfócitos T auxiliares, quando comparados ao grupo administrado somente com o vírus. Além disso, as células T de frangos imunizados com os esporos apresentaram níveis de expressão de mRNA das citocinas pró-inflamatórias *IL17* e *IFN-γ* significativamente superiores aos de animais que foram vacinados com uma vacina comercial contra o H9N2 (Lee et al., 2020), indicando o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1 e Th17.

Uma outra abordagem que tem se mostrado eficiente consiste no uso de esporos de *Bacillus* como sistema de apresentação e entrega de antígenos vacinais (Tavassoli et al., 2013). Estudos mostram que antígenos podem ser expressos na superfície do esporo através da fusão de genes da proteína alvo com genes codificantes para proteínas abundantes presentes na capa do esporo, como a CotB, CotC ou CotG, que são sintetizados durante a esporulação e ficam ancorados na capa do esporo, permitindo a apresentação do antígeno às células do sistema imune (Ricca & Cutting, 2003; Paccez et al., 2007; Guoyan et al., 2019). Esporos de *B. subtilis* apresentando a TTFC em sua superfície obtiveram resultados promissores. Quando administrados via oral e nasal em camundongos, demonstraram níveis elevados de anticorpos antígeno-específicos e proteção efetiva contra doses letais da toxina. Altos níveis de IgG1 e IgG2b foram observados, indicando uma resposta do tipo Th2 (Duc et al., 2003; Ciabattini et al., 2004).

Os antígenos também podem ser adsorvidos na parede dos esporos em condições de baixo pH, por interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre o esporo e o imunógeno (Ricca et al., 2014). Camundongos imunizados pela via oral e nasal com antígenos adsorvidos a esporos de *B. subtilis* tornaram-se protegidos contra o desafio com a toxina do tétano e com a toxina alfa de *Clostridium perfringens* (Huang et al., 2010). Esporos inativados de *B. subtilis* obtiveram bons resultados como adjuvante de mucosa em camundongos vacinados contra o vírus Influenza. Quando administrados

via intranasal, estimularam a produção de altos níveis de IgG2a e aumento de citocinas como IFN- γ , IL2 e IL6, indicando o desenvolvimento de uma resposta Th1/Th2 balanceada (Song et al., 2012).

Bacillus atrophaeus também foi avaliado quanto ao seu potencial adjuvante (Oliveira-Nascimento et al., 2012). Essa espécie foi previamente caracterizada como *B. subtilis*, mas foi observada a produção de um pigmento sob certas condições de cultivo levaram a reclassificação deste microrganismo como uma nova espécie denominada *B. atrophaeus* (Fritze & Diger Pukall, 2001). Esporos inativados de *B. atrophaeus* foram utilizados para adsorver o vírus da raiva e testados como adjuvante juntamente com a saponina em camundongos. A associação dos esporos com o vírus adsorvido mais a adição de saponina estimularam altos níveis de anticorpos neutralizantes, quadruplicando o valor quando comparados a administração dos adjuvantes separadamente (Oliveira-Nascimento et al., 2012).

Bacillus toyonensis apresentou potencial adjuvante quando administrado como probiótico em camundongos vacinados com uma vacina experimental inativada contra o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5), os quais apresentaram um aumento dos níveis de IgG total e de transcritos das citocinas IFN- γ , IL12 e IL10, sugerindo o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1 (Roos et al., 2012). Em outro estudo, camundongos vacinados contra o BoHV-5 que receberam inoculação por via subcutânea de esporos de *B. toyonensis* apresentaram aumento significativo nos níveis de IgG total, dos isotipos IgG1 e IgG2a e nos títulos de anticorpos neutralizantes, sugerindo o desenvolvimento de uma resposta imune balanceada Th1/Th2 (Santos et al., 2016). Camundongos vacinados com a glicoproteína D recombinante de BoHV-5 e suplementados com *B. toyonensis* em dois períodos diferentes apresentaram um aumento dos níveis de IgG total, IgG1 e IgG2a, além de títulos significantes de anticorpos neutralizantes contra o vírus, bem como altos níveis de transcritos de genes de citocinas pró-inflamatórias como IL4 e IL12 (Santos et al., 2018). Camundongos suplementados com esporos de *B. toyonensis* e vacinados pela via intranasal com o fragmento C da toxina tetânica (TTFC) adsorvido a esporos de *B. subtilis* apresentaram um aumento da resposta imune humoral, com produção de imunoglobulina A secretória (sIgA) e alta produção de IgG, além de maiores níveis de transcritos das citocinas IL6, IL10 e IFN- γ , quando comparados aos de animais não suplementados, indicando a possibilidade de utilização de esporos de *B. toyonensis* como adjuvante de mucosa (Santos et al., 2020a). Esporos de *B. toyonensis* foram

testados como adjuvante em camundongos vacinados por via subcutânea com a rgD de BoHV 5 e o adjuvante alumen (Santos et al., 2021). Os animais que receberam esporos apresentaram um aumento dos níveis de IgG total, IgG2a e anticorpos neutralizantes contra o vírus. Maiores níveis de transcrição de mRNA das citocinas *IL4*, *IL12* e *IFN-γ* foram observados nos esplenócitos dos animais que receberam esporos, enquanto que macrófagos RAW264.7 após serem estimulados com esporos aumentaram sua proliferação e demonstraram elevados níveis de transcritos de *IL4* e *IL12*, indicando uma modulação da resposta imune humoral e celular dos animais mediada pelos esporos.

Bacillus toyonensis também apresentou propriedades imunomoduladoras quando avaliado em ovinos (Roos et al., 2018; Santos et al., 2020b). Ovelhas vacinadas contra o BoHV-5 e suplementadas com o probiótico *B. toyonensis* apresentaram maior taxa de produção de anticorpos IgG totais e anticorpos neutralizantes contra o vírus, quando comparadas com animais que não receberam suplementação (Roos et al., 2018). Ovinos suplementados com *B. toyonensis* por 5 dias antes da primeira e segunda dose de uma vacina contendo a toxina épsilon recombinante (rETX) de *C. perfringens* apresentaram um aumento nos níveis de IgG total e dos isotipos IgG1 e IgG2 quando comparados ao grupo não suplementado. Além disso, as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) dos ovinos suplementados com *B. toyonensis* apresentaram maiores níveis de expressão de mRNA das citocinas *IL2*, *IFN-γ* e do fator de transcrição *Bcl6*, quando comparados ao grupo controle (Santos et al., 2020b).

2.5 Herpesvírus bovino

2.5.1 Herpesvírus bovino tipo 5

O herpesvírus bovino tipo 5 foi descrito pela primeira vez na Austrália em 1962 e foi previamente classificado como uma variante neuropatogênica do BoHV-1 – BoHV1.3 (French, 1962). No entanto, em 1992, foi possível distinguir os dois vírus devido a particularidades de seus genomas e propriedades antigênicas (Del Médico Zajac et al., 2010). O BoHV-5 apresenta um genoma linear de DNA fita dupla contido no interior de um capsídeo icosaédrico, composto de 161 capsômeros que envolvem e protegem o material genético, formando um nucleocapsídeo. Esta organização está embebida em um material amorfo denominado tegumento que contém várias

proteínas virais, que é envolvido por um envelope formado por uma bicamada lipídica onde estão inseridas na superfície as glicoproteínas virais, as quais são necessárias para a adsorção e penetração do vírus na célula (Shahin et al., 2017; Yue et al., 2020).

O BoHV-5 é o agente causador da meningoencefalite herpética em bovinos, doença que tem ocorrência mais frequente em animais jovens submetidos a situações de estresse. O vírus tem a capacidade de se replicar no sistema nervoso central e tem uma taxa de letalidade quase sempre de 100%, causando necrose do córtex cerebral e acarretando anualmente em grande prejuízo econômico para a bovinocultura (Vogel et al., 2003; Campos et al., 2009).

A transmissão do vírus ocorre por contato direto ou indireto com animais ou secreções contaminadas. O vírus penetra pelo trato respiratório superior e inicialmente começa sua replicação na mucosa nasal, migrando em seguida para os neurônios sensoriais, preferencialmente no gânglio trigêmeo. Consequentemente, o vírus pode estabelecer infecção latente no animal, com ausência de sintomas clínicos evidentes; ou ser transportado para o encéfalo, atingindo o córtex cerebral e disseminando-se por todo o sistema nervoso central, acarretando em sinais como convulsões, andar cambaleante, depressão, cegueira, entre outros, que geralmente levam à morte (Rissi et al., 2007).

O BoHV-1 é um importante patógeno de bovinos e causador da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), sendo responsável por grandes perdas econômicas (HAGE et al., 1996). A porta de entrada natural do vírus é a mucosa do trato respiratório e genital, podendo causar uma série de manifestações como rinotraqueíte, vulvovaginite pustulosa infecciosa, balanopostite, conjuntivite, aborto, enterite e mais raramente encefalite (Wyler et al., 1989; Silva et al., 2007). Sua transmissão é semelhante à do BoHV-5, podendo ocorrer de forma direta através de aerossóis e pelo contato com secreções respiratórias, oculares ou genitais contaminadas. Os sinais clínicos incluem febre, mucosas avermelhadas, diminuição na produção de leite, secreção purulenta, infertilidade e abortamento (Fino et al., 2012).

A principal medida profilática contra a enfermidade causada por BoHV-1 e BoHV-5 é a vacinação, sendo que existem no mercado vacinas contra infecções pelo BoHV-1, as quais também são utilizadas para prevenir infecções por BoHV-5 (Campos et al., 2009). Entretanto, o nível de proteção cruzada fornecido por vacinas contra BoHV-1 parece não ser suficiente para conferir uma proteção satisfatória para o BoHV-5 (Cascio et al., 1999; Spilki et al., 2004; Silva et al., 2006).

2.5.2 Resposta imune à infecção contra o herpesvírus bovino tipo 1 e 5

A primeira resposta do sistema imune à infecção contra os herpesvírus bovinos tipo 1 e 5 consiste em resposta inflamatória e reações causadas pelas células do sistema imune inato, como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células *Natural Killer* (NK) (Alves Dummer et al., 2014). Com a infecção inicial, as células epiteliais da mucosa liberam sinais moleculares para as células infectadas vizinhas, incluindo peptídeos antimicrobianos e a secreção de interferons (Klotman & Chang, 2006; Ackermann et al., 2010). Além disso, o reconhecimento de PAMPs presentes na superfície viral pelos PRRs das células imunes inatas irão desencadear a liberação de citocinas como IL12, TNF- α e IFN- γ , e quimiocinas determinantes para a migração de macrófagos, neutrófilos e DCs para os sítios de infecção, auxiliando no desenvolvimento da resposta imune (Levings & Roth, 2013).

A resposta imune adaptativa inicia com a apresentação de antígenos virais pelas DCs para linfócitos T virgens, que irão se diferenciar em linfócitos T CD8⁺ citotóxicos ou linfócitos T CD4⁺ auxiliares, de acordo com as citocinas e quimiocinas produzidas pelas células imunes durante a resposta antiviral (Lambrecht et al., 2009). A partir desse momento, linfócitos T auxiliares ativam linfócitos B virgens que se diferenciam em células de memória e células plasmáticas secretoras de anticorpos, que irão desempenhar um papel fundamental na neutralização viral. Os linfócitos citotóxicos são responsáveis pela destruição de células infectadas pelo vírus, por meio do reconhecimento de antígenos virais apresentados via MHC I na superfície dessas células e a liberação de enzimas, como perforinas e granzimas (Barry & Bleackley, 2002).

2.5.3 Vacinação contra herpesvírus bovino tipo 5

Alguns trabalhos têm relatado o desenvolvimento e avaliação de vacinas experimentais contra o BoHV-5. Em um estudo prévio, foi analisada a imunogenicidade e a eficácia de vacinas inativadas contra BoHV-1 e BoHV-5 em bezerros, que foram desafiados pela via intranasal com BoHV-5 (Del Médico Zajac et al., 2006). Ambas as vacinas induziram uma resposta imune humoral e celular similares, entretanto os animais apresentaram uma proteção parcial e um terço deles

apresentaram sinais clínicos de encefalite, demonstrando que a proteção foi insatisfatória (Del Médico Zajac et al., 2006).

Brum et al. (2010) relataram anteriormente a construção do vírus BoHV-5 geneticamente modificado, com ausência dos genes codificantes para a glicoproteína E e para a enzima timidina quinase. O vírus recombinante demonstrou ser imunogênico em bezerros e capaz de conferir proteção frente ao desafio por via intranasal com o BoHV-5 e também com o BoHV-1 (Anziliero et al., 2011). Além disso, induziu resposta sorológica diferenciável da resposta induzida pela infecção natural, pelo uso de um ELISA anti-gE (Brum et al., 2010; Anziliero et al., 2011), apresentando potencial para ser usada na formulação de vacina atenuadas contra o BoHV-1 e BoHV-5.

Outro estudo prévio realizado em bovinos avaliou a eficácia de uma vacina experimental contra BoHV-5 administrada por via intravaginal, contendo o vírus inativado associado a subunidade B recombinante da enterotoxina termolábil de *E. coli* (rLTB) e/ou à goma xantana (Siedler, 2012). A vacina demonstrou-se capaz de estimular uma resposta imune local e sistêmica, incrementando os níveis de IgA e IgG no soro e nas mucosas nasal e vaginal dos bovinos imunizados e apresentando aumento nos níveis de transcrição de mRNA das citocinas *IL2* e *IL13* (Siedler, 2012).

Anziliero et al. (2015) testaram vacinas comercializadas no Brasil contra o BoHV-1, BoHV-5 e BVDV em bovinos. Ao todo foram utilizadas seis vacinas inativadas com diferentes adjuvantes oleosos e hidróxido de alumínio, uma viva atenuada termossensível e uma vacina viva quimicamente alterada. Os animais foram divididos em 8 grupos, cada grupo foi imunizado com uma vacina e submetidos ao teste de soroneutralização frente a cada vírus. A maior parte das vacinas foi capaz de induzir anticorpos com atividade neutralizante contra o BoHV-5, porém três delas apresentaram soroconversão parcial (somente em 50%, 60% e 70% dos animais). Além disso, os títulos de anticorpos neutralizantes obtidos contra o BoHV-5 foram, no geral, inferiores quando comparados aos títulos de anticorpos neutralizantes obtidos contra o BoHV-1.

No Brasil, a vacinação contra o BoHV-5 é voluntária e há várias empresas que comercializam vacinas contra o BoHV-1, também utilizadas contra o BoHV-5. Normalmente, elas são formuladas em associação com outros antígenos (vírus da diarreia viral bovina (BVDV tipo I e II, Parainfluenza-3 (PI3), vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) e *Leptospira* spp.) e na forma inativada. As vacinas atenuadas

termossensíveis também têm sido comercializadas no Brasil, as quais contêm o vírus vivo quimicamente modificado que se replica apenas em temperaturas mais baixas, como por exemplo nas mucosas (30-33 °C), do que no corpo (37 °C), o que impede o desenvolvimento de infecções sistêmicas após a vacinação (Patterson et al., 2012). Visando o uso em programas de erradicação, existem também vacinas geneticamente modificadas, que oferecem a possibilidade de diferenciação sorológica de animais vacinados de naturalmente infectados, sendo bastante utilizadas na Europa (Muytkens et al., 2007). As vacinas vivas geneticamente atenuadas induzem uma rápida resposta e imunidade duradoura. Entretanto, este tipo de vacina possui potencial abortivo e deve-se atentar para o seu uso em vacas prenhas (Nandi et al., 2009). As vacinas inativadas comparadas às atenuadas apresentam a vantagem de não possibilitar a replicação viral nas células do hospedeiro, evitando o aborto, risco de reversão da virulência e de infecção latente pela cepa viral, embora na maioria das vezes necessitem do uso de adjuvantes em sua formulação (Jones et al., 2011).

Como exemplos de vacinas inativadas comercializadas no Brasil contra o BoHV-1 e BoHV-5, está a Supravac 10® (fabricada pela Vencofarma), indicada contra a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), BVDV, vírus respiratório sincicial, parainfluenza, leptospiroses e pasteurelose bovinas ; a vacina IBR/BVD® (fabricada pela Hertape Calier) que compõe-se do vírus da IBR/VIP (IBR colorado) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV-NADL e BVDV-Nova Iorque) e a vacina Bayovac® Reprodução 15 para prevenção da IBR, BVDV, leptospiroses e campilobacterioses em bovinos (Viu et al., 2014). Também está disponível no mercado a vacina termossensível CattleMaster GOLD FP 5/L5®, sendo a primeira a conseguir aprovação do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) para proteção fetal contra a BVDV (tipos 1 e 2) e o aborto por IBR, além de proteger os bovinos contra outras doenças que provocam falhas reprodutivas e problemas respiratórios (Viu et al., 2014).

2.5.4 Glicoproteína D de herpesvírus bovino tipo 5

A gD de BoHV-5 é composta de 417 aminoácidos, distribuídos em um peptídeo sinal de 18 aa, um domínio extracelular e uma região transmembrana, e possui massa molecular de aproximadamente 71 kDa (Tikoo et al., 1990). Ela é essencial para a ligação e penetração do vírus nas células permissivas e é

abundantemente encontrada no envelope viral, sendo um dos principais alvos da resposta imune do hospedeiro (Alves Dummer et al., 2014). A ligação da gD na célula do hospedeiro é efetivada principalmente por meio de receptores da família do fator de necrose tumoral (TNF) e de receptores de nectinas (Šedý et al., 2008). Os receptores de nectina representam moléculas de adesão celular independentes de cálcio, sendo que a gD de BoHV-5 é capaz de interagir com uma gama maior desses receptores se comparada a gD de BoHV-1 (Gabev et al., 2010).

A gD é importante para a neutralização viral e na geração da resposta imune inicial contra o vírus, pois é alvo principal das células NK e uma das primeiras proteínas a serem expostas na membrana plasmática da célula infectada (Babiuk et al., 1996). Anticorpos anti-gD são reconhecidos por células NK e podem estimular a citotoxicidade celular mediada por anticorpo (ADCC) (Babiuk et al., 1987). A proteína gD também é importante no desenvolvimento da resposta imune adaptativa, pois torna-se alvo de linfócitos T citotóxicos em bovinos, além de ser capaz de estimular linfócitos T CD4⁺ (Splitter et al., 1988).

A expressão da gD recombinante (rgD) de BoHV-5 na levedura *Pichia pastoris* foi anteriormente relatada e avaliada quanto a sua antigenicidade e imunogenicidade, demonstrando que a rgD apresenta as mesmas características antigênicas nativas que são encontradas no BoHV-5 (Dummer et al., 2009). A glicoproteína D recombinante de BoHV-5 conservou epítomos neutralizantes contra o vírus e quando associada com adjuvantes oleosos induziu anticorpos neutralizantes em camundongos, além de estimular altos níveis de citocinas como *IFN-γ* e *IL17* (Dummer et al., 2014). A rgD também foi capaz de gerar anticorpos neutralizantes quando associada a citocina IL17A recombinante e a adjuvantes oleosos em bovinos (Araujo et al., 2018; Gonçalves et al., 2021).

Anticorpos neutralizantes contra o vírus constituem umas das mais importantes correlações da proteção clínica contra BoHV-1 e BoHV-5, já que os dois vírus têm alto grau de semelhança entre si. Assim, a construção de uma vacina recombinante formulada com um adjuvante que estimule o desenvolvimento de uma resposta imune balanceada pode induzir uma forte resposta imune humoral e celular (Alves Dummer et al., 2014).

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

Esporos de *Bacillus toyonensis* associados a glicoproteína D recombinante de Herpesvírus Bovino tipo 5 são capazes de amplificar a resposta imune em camundongos.

3.2 Objetivo Geral

Avaliar o efeito adjuvante de esporos de *Bacillus toyonensis* associados a glicoproteína D recombinante de Herpesvírus Bovino tipo 5 em camundongos.

3.3 Objetivos Específicos

- Avaliar a dinâmica dos níveis de IgG total em camundongos vacinados com a rgD de BoHV-5 associada a esporos de *B. toyonensis* vivos e inativados adsorvidos ou não ao hidróxido de alumínio;
- Avaliar a dinâmica dos níveis de isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b em camundongos vacinados com a rgD de BoHV-5 associada a esporos de *B. toyonensis* vivos e inativados adsorvidos ou não ao hidróxido de alumínio;
- Determinar os títulos de anticorpos neutralizantes contra o BoHV-5 através do ensaio de soroneutralização;
- Avaliar os níveis de transcrição de mRNA das citocinas *IL4*, *IL10*, *IL12*, *IL17* e *IFN-γ* nos esplenócitos murinos;
- Realizar uma revisão sistemática, buscando diferentes estudos utilizando esporos de bactérias do gênero *Bacillus* como adjuvantes de vacinas experimentais em modelo animal.

4 CAPÍTULOS

4.1 Manuscrito 1 – *Bacillus* spores as vaccinal adjuvants – a systematic review

Manuscrito a ser submetido à revista *Vaccine*

***Bacillus* spores as vaccinal adjuvants – a systematic review**

Lucas Reichert Maubrigades ^a, Francisco Denis Souza Santos ^a, Ezio Ricca ^b, Fábio Pereira Leivas Leite ^{a*}

^a Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, 96160-900 Capão do Leão, RS, Brazil.

^b Dipartimento di Biologia, Università di Napoli Federico II, 80126 Naples, Italy.

* Corresponding author: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, 96160-900 Capão do Leão, RS, Brazil. E-mail: fabio_leite@ufpel.edu.br, fleivasleite@gmail.com (F.P.L. Leite).

Abstract

Bacillus spores have immunomodulatory properties and are being tested as vaccinal adjuvants. We systematically reviewed studies that have assessed the effect of spores of *Bacillus* genus bacteria as adjuvants for experimental vaccines with different antigens tested in animal model. The literature search of PubMed, Web of Science and Scopus was implemented with studies ranging between 1990 and 2020. The data extracted included author, year of publication, title, number of animals, spore's concentration, administration route of vaccine doses, microorganism, type of vaccine, spores' approach and parameters from the results, such as humoral and cellular immune response of the animals. The quality of studies was analyzed through an adapted CAMARADES checklist. From the total of 922 studies, we selected 27 to

include in the systematic review, which tested three different spore-forming *Bacillus* species in several viral, bacterial and parasitic vaccines, in three different spore approaches: recombinant, non-recombinant and supplementation as probiotics. The animals orally supplemented or vaccinated with the spores showed significantly higher antibody titers, significant increased transcription and expression of pro-inflammatory cytokines and proliferation of immune cells, such as CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, when compared to animals that did not receive spores in vaccine formulation. The data evidenced by the studies included in our review suggest the use of *Bacillus* spores as promising adjuvants for vaccines. However, it is important that future studies are carried out focusing on the elucidation of mechanisms of action by which spores modulate the immune response, mainly regarding the activation and maturation of different populations of immune system cells.

1. Introduction

The use of vaccines is the most efficient alternative for prophylaxis and the control of infectious diseases [1]. Despite the significant success of vaccines, development of safe and strong vaccines is still required due to the emergence of new pathogens, re-emergence of old pathogens and suboptimal protection conferred by existing vaccines [2]. Recombinant vaccines represent an attractive strategy by which the limitations of conventional vaccines (based live or non-live microorganisms) can be overcome, mainly regarding safety and stability [3]. The vaccines based on recombinant antigens are considered relatively safer owing to their low adverse effects, including local irritations and the risk of reversion to virulence [4]. However, recombinant subunit vaccines are often poorly immunogenic and require additional components to stimulate protective immunity [5].

Adjuvants are compounds that enhance the immunogenicity of an antigen and are an important component of vaccines [2]. They are capable of reducing the amount of antigen used,

the amount of doses needed to induce an efficient response against the antigen in the host, increasing the duration of protection, the immunogenicity of highly purified recombinant antigens and consequently inducing an efficient protective response in the host [6, 7]. In the last decades, the search for new possible adjuvant molecules has increased and some bacterial compounds have been assessed due to its immunomodulatory properties, including bacterial spores of *Bacillus* genus.

Spores of the *Bacillus* genus, such as *Bacillus subtilis*, *Bacillus toyonensis*, and *Bacillus atrophaeus*, have been used in experimental studies which demonstrated that they can confer strong adjuvanticity to animal and human vaccines [9-13]. The spores can be used to improve vaccine efficacy in two different approaches: the recombinant one, by which the spores are genetically engineered in order to express a target antigen in its surface coat; and the non-recombinant one, by which spores adsorb the antigen to its surface coat or are co-administered to them in the vaccine formulation [14]. Both cases have been successfully reported in the literature with promising results, showing that spores may be an alternative form to improve the immune response to vaccines [10, 15, 16]. Here in this study, we systematically review publications evaluating the use of spores from *Bacillus* bacteria as adjuvants for experimental vaccines.

2. Material and Methods

2.1 Search strategy for identification of studies

The search was conducted using MEDLINE (via PubMed), Web of Science and Scopus (Elsevier) including articles with English language limitation between 1990 and 2020. The following text word terms used were: (*Bacillus* OR “*Bacillus* genus”) AND (spores OR spore OR “bacterial spores” OR “bacterial spore” OR “spore surface display”) AND (vaccines OR vaccine) AND (adjuvants OR adjuvant OR immunomodulator OR immunomodulators OR “immunomodulatory effect” OR “immunomodulatory properties” OR “adjuvant effect” OR

“adjuvant properties”) AND (“immune response” OR “immune responses” OR “immune reaction” OR “immune reactions” OR “immunological response” OR “immunological responses” OR “immunologic response” OR “immunologic responses” OR “immune system responses” OR “immune system response”) AND (antibody OR antibodies OR immunoglobulin OR immunoglobulins OR “antibody production” OR “antibodies production” OR “Ig production”).

2.2 Inclusion and exclusion criteria

The articles included in the review fulfilled the following inclusion criteria: comparing a group treated with spores with a control group (without treatment with spores), articles testing the spores in any animal model, articles with a significant group of animals, articles evaluating the humoral and/or cellular immune response after vaccination of the animals. Only articles analyzing spores as adjuvants as the primary focus of the work were included. Studies investigating spores other than *Bacillus* genus were excluded. Observational studies, narrative/systematic reviews, case reports, letters, editorials, and commentaries were also excluded, but read to identify potential additional studies.

2.3 Articles selection

Firstly, all publications resulting from the search were independently exported by two reviewers (L.R.M and F.D.S.S) to a reference manager software. The title and abstract were assessed, all potentially relevant articles were retained, and the full text of these studies was examined to determine which studies satisfied the inclusion criteria. In the case of any differences of opinion or disagreements between the two reviewers, an adjudicator was consulted.

2.4 Data extraction and quality analysis

The data from the screened articles were extracted, including author, year of publication, title, country, number of animals, spore’s concentration, administration route of vaccine doses,

microorganism, type of vaccine, spores approach (recombinant or non-recombinant) and parameters from the results, including humoral and cellular immune response. Quality of studies was analyzed through an adapted CAMARADES checklist [17] and also assigned by a consensus of two study team members, with discrepancies adjudicated by a third party. The items in the checklist adapted from CAMARADES are: (1) Peer-reviewed publication. (2) Reporting species/strain of animals in the title or abstract and in the full text. (3) Statement of compliance with animal welfare regulations. (4) Reporting homogeneity of sample by age or weight of animals. (5) Reporting blinded assessment of outcome. (6) Statement of possible conflicts of interest. (7) Reporting randomisation of treatment allocation. (8) Reporting sample size calculation. (9) Reporting criteria for inclusion and/or exclusion of data. (10) Reporting concealment of treatment allocation.

3. Results

As demonstrated in the flow chart (Fig. 1), we identified 922 studies, with 870 remaining after removing duplicates and triplicates. After the titles and abstracts were screened, 68 articles remained for full-text assessment, with 4 additional records identified through references section of the studies. Of these full-text articles, 27 studies matched our selection criteria and were included in our systematic review. The included articles evaluated the use of spores by the recombinant method (7) or non-recombinant method (20). Overall, three different species of *Bacillus* were found to be evaluated in all the articles that were included in the systematic review: *B. atrophaeus* (1); *B. subtilis* (19) and *B. toyonensis* (7). The spore's concentration used in the studies ranged from 10^6 to 10^{12} CFU/ml. All of the systematic review studies are represented in the Table 1.

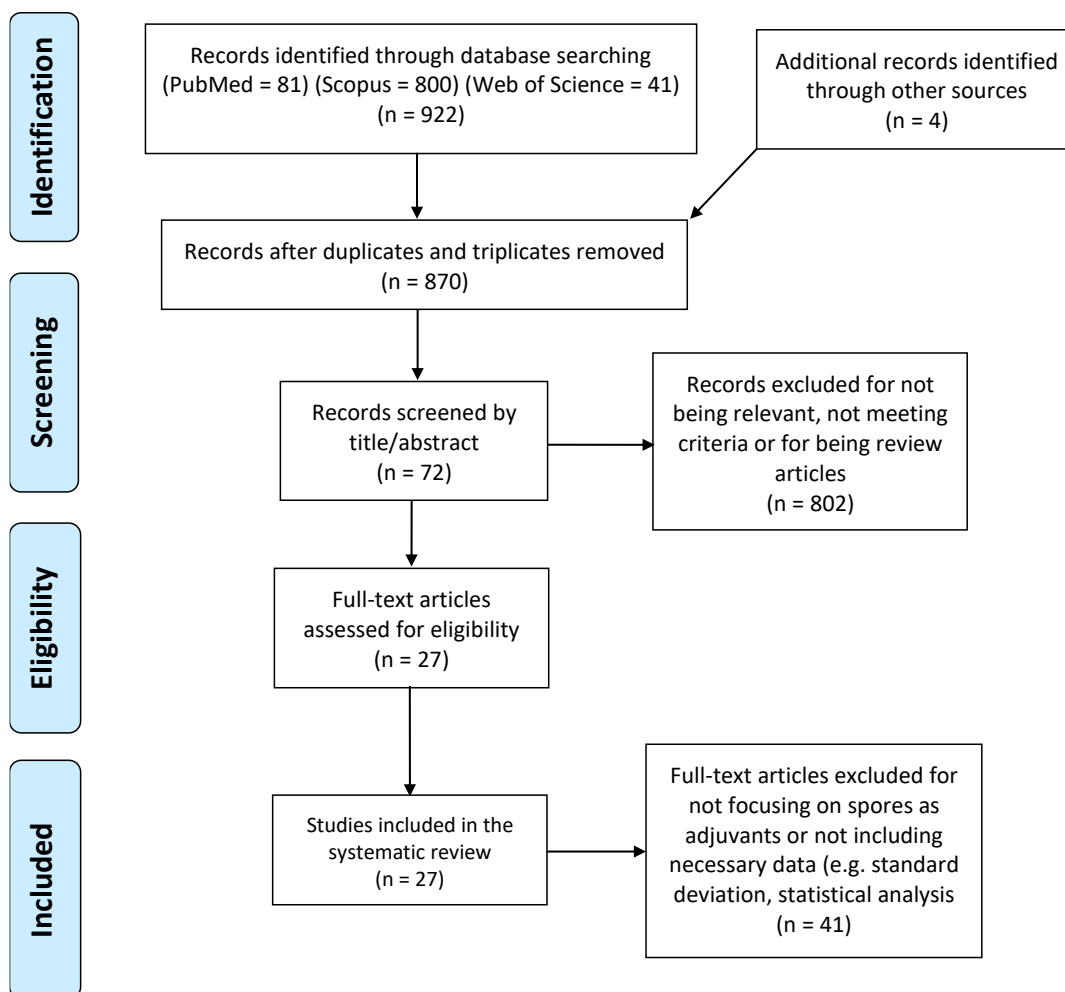


Fig.1. PRISMA diagram of study selection process.

Table 1Studies reporting the adjuvant effect of *Bacillus* spp. spores in vaccines.

Authors	<i>Bacillus</i> strain	Vaccinal antigen	Spore's concentration (CFU)
Recombinant approach studies			
Cao, Hao, Wang, 2019	<i>B. subtilis</i>	VP1 protein of Coxsackievirus A16	Not mentioned
Das et al., 2017	<i>B. subtilis</i>	Ag85B and CFP10 of <i>M. tuberculosis</i>	2×10^8
Duc et al., 2003	<i>B. subtilis</i>	TTFC of <i>C. tetani</i>	10^9 and 10^{10}
Jiang et al., 2019	<i>B. subtilis</i>	VP4 protein of Reovirus grass carp	2×10^{11}
Mou et al., 2016	<i>B. subtilis</i>	Hemagglutinin of H5N1 avian Influenza	1×10^{10}
Wu et al., 2017	<i>B. subtilis</i>	Cysteine protease of <i>C. sinensis</i>	1×10^9
Yang et al., 2020	<i>B. subtilis</i>	GAPDH enzyme of <i>H. contortus</i>	10^6 to 10^{12}
Non-recombinant approach studies			
Huang et al., 2010	<i>B. subtilis</i>	TTFC, PA, GST-Cpa and GST	2×10^9 and 5×10^{10}
Isticato et al., 2013	<i>B. subtilis</i>	LTB of <i>E. coli</i>	2×10^9
Nascimento et al., 2012	<i>B. atrophaeus</i>	Rabies virus	1×10^6
Reljic et al., 2013	<i>B. subtilis</i>	MPT64 and Acr-Ag85B of <i>M. tuberculosis</i>	2×10^9
Song et al., 2012	<i>B. subtilis</i>	H5N1 Influenza	1×10^9
Coadministration of spores			
Aps et al., 2015	<i>B. subtilis</i>	Plasmid encoding E7 protein	2×10^7
Barnes et al., 2007	<i>B. subtilis</i>	Ovalbumin and TTFC of <i>C. tetani</i>	10^6 to 10^8
Copland et al., 2018	<i>B. subtilis</i>	Ag85B, ACR, and HBHA of <i>M. tuberculosis</i>	1×10^9
De Souza et al., 2014	<i>B. subtilis</i>	p24 of HIV	2×10^9
Esparza-Gonzalez, Troy, Izzo 2014	<i>B. subtilis</i>	ESAT-6 of <i>M. tuberculosis</i>	1×10^6
Huang et al., 2019	<i>B. subtilis</i>	Inactivated porcine epidemic diarrhea virus	1×10^9
Lee et al., 2020	<i>B. subtilis</i>	Inactivated H9N2 avian Influenza	2×10^9
Liang et al., 2013	<i>B. subtilis</i>	Inactivated H5N1 avian Influenza	5×10^8
Maubrigades et al., 2020	<i>B. toyonensis</i>	Glycoprotein D of BoHV-5	2×10^9
Supplementation of spores			
Coppola, Conceição, Gil-Turnes, 2005	<i>B. toyonensis</i>	<i>E. coli</i> bacterin and Canine-Parvovirus (CP-2)	1×10^6
Roos et al., 2012	<i>B. toyonensis</i>	Inactivated BoHV-5	1×10^6
Roos et al., 2018	<i>B. toyonensis</i>	Inactivated BoHV-5	1×10^6
Santos et al., 2018	<i>B. toyonensis</i>	Glycoprotein D of BoHV-5	1×10^6
Santos et al., 2020a	<i>B. toyonensis</i>	TTFC of <i>C. tetani</i>	1×10^6
Santos et al., 2020b	<i>B. toyonensis</i>	Epsilon toxin (ETX) of <i>C. perfringens</i>	3×10^8

3.1 Effects of spores administered by the recombinant approach

Seven studies testing *B. subtilis* spores as the recombinant approach were found in the search. Three studies tested the use of spores in vaccine formulations against bacterial pathogens [18-20]. Of these, the first one tested the spores displaying the tetanus toxin fragment C (TTFC) administered by oral and intranasal route of immunization in mice [18]. Recombinant spores were able to induce a mucosal immune response with IgA production and a systemic

immune response with IgG and its isotypes IgG1, IgG2a and IgG2b production, higher than the controls, in addition to protection against a lethal dose of tetanus toxin. The second one reported the use of recombinant spores presenting two antigens of *Mycobacterium tuberculosis* intranasally administered in mice [19]. The animals vaccinated with the recombinant spores presented an improvement in humoral immune response, with serum IgG production and high levels of cytokines, mainly IFN- γ , in the spleen. The third study evaluated the use of spores presenting the cysteine protease of *Clonorchis sinensis* in mice intraperitoneally immunized [20]. Animals that received the recombinant spores presented significant higher levels of total IgG, IgG1 and IgG2 isotypes, higher cytokine secretion levels in splenocytes and achieved a better effect of fighting against *C. sinensi* infection, by slowing down the process of fibrosis.

Another three studies evaluated the use of spores in viral experimental vaccines [21-23]. One study demonstrated that recombinant spores presenting the hemagglutinin (HI) of H5N1 avian Influenza induced a significant improvement of antigen uptake by bone marrow dendritic cells (DCs) and also higher T cells proliferation rate after immunization in chickens, when compared to immunization with inactivated H5N1 only [21]. In addition, secretion of pro-inflammatory cytokines and the expression of Toll-like receptors (TLRs) were observed in the trachea and small intestine of chickens immunized with the recombinant spores, as well as significant higher levels of IgG and HI in serum and IgA in trachea, when compared to control. Another study showed that spores presenting VP1 gene from Coxsachie virus A16 (CA16) in the spore coat and intranasally administered in mice were able to induce superior levels of IgG, IgA and neutralizing antibodies, compared with control group [22]. The last study tested recombinant spores presenting the VP1 protein of grass carp reovirus (GCRV) orally administered in carps [23]. They induced higher levels of IgM and IgZ until the fourth week analyzed when compared with a commercial attenuated GCRV vaccine (PuLin 225 Biological Products Co., Ltd., Guangzhou, China), in addition to higher cytokines mRNA transcription

levels in spleen and kidney. When challenged by the virus, the groups immunized with recombinant spores also presented significant lower viral load in all the tissues evaluated when compared to the naive group and similar levels in muscle and liver tissues when compared to the commercial vaccine group.

One study also tested the use of spores in an experimental parasitic vaccine formulation against *Haemonchus contortus* in mice and sheep [15]. Both species of animals were orally immunized with recombinant spores and induced the development of humoral immune response with significant higher levels of IgA, IgG and its isotypes IgG1 and IgG2a, and a cell-mediated immune response with high levels of cytokines mRNA transcription. The sheep that received the recombinant spores had body weights close to the uninfected controls and significant lower parasite loads when compared to the infected animals.

3.2 Effect of spores presenting the antigen by adsorption on the spore surface

Five studies testing the use of spores adsorbing antigens on its spore coat in the vaccine formulation were found, and two of these studies evaluated the spores in viral experimental vaccines [9, 10]. Among these, the first one reported the use of *B. atrophaeus* inactivated spores adsorbing the rabies virus as an adjuvant in association with saponin in mice [9]. The association of spores with the adsorbed virus plus the addition of saponin stimulated high levels of neutralizing antibodies, quadrupling the value when compared to the administration of adjuvants separately [9]. The other study evaluated the use of *B. subtilis* spores as a mucosal adjuvant for an H5N1 vaccine [10]. Mice that received spores adsorbing the inactivated virus presented an increase in humoral and cell-mediated immune responses, with IgG, IgG2a and IgA production. All the animals that received the spores adsorbed with the virus were fully protected when challenged with 20 median lethal doses (20LD50) of H5N2 virus and also presented high levels of mRNA cytokine secretion of *IL6*, *IL2* and *IFN-γ* in splenocytes [10].

The other three last studies used the spores adsorbing bacterial antigens on the spore surface coat [24-26]. The first one reported that mice vaccinated by oral and intranasal routes with *B. subtilis* spores adsorbing some antigens can be protected against challenge with tetanus toxin, *C. perfringens* alpha toxin and could survive challenge with anthrax toxin [24]. A second study described the efficient adsorption of the binding subunit of the heat-labile toxin (LTB) of *E. coli* on the surface of *B. subtilis* spores, that when intranasally administered to groups of mice, the spore-adsorbed LTB was able to induce a specific immune response with the production of serum IgG and fecal sIgA and of IFN- γ in spleen and mesenteric lymph nodes (MLN) of the immunized animals [25]. The last study showed that mice immunized intranasally with inactivated coated spores of *B. subtilis* presenting two *M. tuberculosis* antigens developed humoral and cellular immune responses with higher production of IgG and multifunctional T cells, specially IFN- γ -producing [26]. In addition, mice vaccinated with the spore-adsorbed vaccine formulations, presented significantly reduced bacterial loads in their lungs and spleens following pathogenic challenge.

3.3 Effect of spores co-administered with antigens in vaccine formulation

Nine studies that used spores co-administered to the antigens in vaccine formulations were found. Three of these tested the spores co-administered with whole inactivated virus as vaccinal antigens [27-29]. The first of these studies reported the intranasally coadministration of inactivated avian influenza H5N1 virus (IAIV) and different TLRs ligands as adjuvants in chickens [27]. *Bacillus subtilis* spores associated with IAIV promoted higher levels of IgG in serum and sIgA in trachea and nasal cavity when compared to IAIV alone. In addition, *B. subtilis* spores as the adjuvant for nasal IAIV had the highest effect on the mRNA transcription of *IL6* and *IL12* cytokines by the chicken splenocytes and chickens vaccinated with the IAIV plus *B. subtilis* spores could survive challenge by live H5N1 virus [27]. The second study used *B. subtilis* spores combined with whole inactivated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)

that when orally administered in piglets promoted the production of neutralizing antibodies and proliferation of memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells in intestinal mucosa of the animals [28]. The third one evaluated the effect of *B. subtilis* spores as adjuvants in chickens administered with inactivated avian influenza virus H9N2 [29]. The animals vaccinated with H9N2 plus spores presented higher levels of IgG in serum and enhanced CD4⁺ and CD8⁺ T cell proliferation, when compared to the group administered only with the virus. In addition, the vaccine formulation of H9N2 plus spores induced higher levels of mRNA transcription of the pro-inflammatory cytokines *IFN-γ* and *IL17* in T cells of the spleen in comparison to a group vaccinated with a commercial oil adjuvant H9N2 vaccine (KBNP, Anyang, Republic of Korea).

Other two studies utilized spores co-administered to viral antigens [30, 16]. In the first one, the co-administration of *B. subtilis* spores with the recombinant HIV p24 gag protein promoted an increase in antibody levels after subcutaneous administration to mice [30]. The spores also promoted the activation of antigen presenting cells and increased expression of major histocompatibility complex (MHC) and CD40 molecules, followed by an increase in the secretion of pro-inflammatory cytokines by the DCs of mice. In addition, a direct role of innate immunity was found in the immunomodulatory properties of spores, as strains of knockout mice for the MyD88 and TLR2 genes showed no spore-mediated adjuvant effects [30]. The other study showed that *B. toyonensis* live and killed spores tested in association with alum adjuvant in mice vaccinated subcutaneously with the Herpesvirus bovine type 5 (BoHV-5) recombinant glycoprotein D (rgD) induced higher levels of total IgG, IgG1 and IgG2a, when compared to the animals that did not received spores [16]. In addition, splenocytes from mice that received the spores plus alum had significant higher mRNA transcription levels of pro-inflammatory cytokines *IL12*, *IL17* and *IFN-γ* when compared to the control group.

Two studies tested the spores co-administered to *M. tuberculosis* antigens [31, 32]. The first one tested the use of *B. subtilis* spores and the monophosphoryl lipid A (MPL) as adjuvants

of a *M. tuberculosis* vaccine [31]. When inoculated into mice, *B. subtilis* spores induced serum antibodies production and Th1 pro-inflammatory cytokines production in splenocytes, similarly to MPL, but failed to induce significant levels of *IL17A* and were unable to significantly reduce the mycobacterial burden after pulmonary infection with *M. tuberculosis*. The other one reported that mice vaccinated subcutaneously with *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), followed by mucosal booster immunizations with *B. subtilis* spores coated with a fusion protein 1 (“FP1”) consisting of three *M. tuberculosis* antigens, presented an elevated antigen-specific IgG and IgA titers in the serum and lung mucosal surface, respectively [32]. In addition, spore-FP1 immunization generated superior antigen-specific memory T-cell proliferation in both CD4⁺ and CD8⁺ compartments and enhanced pulmonary control of *M. tuberculosis* with reduced bacterial burdens in the lungs, compared to BCG immunization alone.

One study tested the spores co-administered to TTFC from *C. tetani* [33]. The study showed that the use of *B. subtilis* spores co-administered with TTFC in mice by intranasal route stimulated the production of higher levels of IgG, IgG1 and IgG2a when compared to tetanus toxoid alone, characterizing a balanced Th1/Th2, in addition to an increase in the production of IgA in mucosal tissues.

Another study tested the spores co-administered to a DNA vaccine encoding the E7 protein type 16 of the human papillomavirus (HPV) in mice [34]. The animals vaccinated parenterally with the DNA vaccine and co-administered with live or killed *B. subtilis* spores had an improvement in activation of specific CD8⁺ T lymphocytes. In addition, stimulation of DCs with different spore concentrations promoted its activation and induced the migration of pro-inflammatory cells, such as neutrophils and eosinophils.

3.4 Effect of spores administered as probiotic

Six studies, all testing *B. toyonensis* spores orally supplemented to enhance the efficacy of vaccines, were found in the search. Three studies tested the spores in order to improve

vaccines based on recombinant bacterial antigens [12, 13, 35]. The first one showed that mice vaccinated with a recombinant D glycoprotein from BoHV-5 and supplemented with the spores in two different periods presented a significant increase in total IgG, IgG1, IgG2a and neutralizing antibodies when compared with the non-supplemented group. Mice that received the spores also had high levels of transcripts from pro-inflammatory cytokine genes such as *IL4* and *IL12* [12]. The second study showed that mice supplemented with *B. toyonensis* spores and vaccinated intranasally with TTFC adsorbed to *B. subtilis* spores presented an increased humoral immune response, with production of secretory immunoglobulin (sIgA) and IgG, in addition to significant higher levels of the cytokines *IL6*, *IL10* and *IFN-γ*, when compared to non-supplemented animals [13]. Moreover, mice immunized with spore-adsorbed TTFC also had significant higher IgG and IgA levels when compared to TTFC alone [13]. The other study showed that ewes supplemented with *B. toyonensis* spores for 5 days prior to the first and second dose of a vaccine containing the recombinant epsilon toxin of *C. perfringens* (rETX) presented an increase in the levels of total IgG, IgG1 and IgG2 isotypes when compared to the non-supplemented group [35]. In addition, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from sheep supplemented with *B. toyonensis* spores showed significant higher levels of mRNA transcription of the cytokines *IL2*, *IFN-γ* and the transcription factor *Bcl6*, when compared to the control group.

Other three studies evaluated spores to improve whole virus vaccines [36-38]. Among these, two tested spores' supplementation in sheep and mice vaccinated with the inactivated BoHV-5 virus [37, 38]. In both studies the supplementation of animals with *B. toyonensis* spores induced superior levels of IgG and neutralizing antibodies against the virus, in addition to higher cytokine mRNA transcripts of *IL10*, *IL17* and *IFN-γ* in the spleen of sheep [38] and *IFN-γ*, *IL12* and *IL10* in spleen of mice [37], when compared to non-supplemented groups. The other study showed that mice supplemented with *B. toyonensis* spores and vaccinated with a

viable vaccine against canine parvovirus (CPV-2, ATCC VR-2017) and with an *E. coli* bacterin had significant higher seroconversion in relation to non-supplemented animals [36].

3.5 Quality assessment

The quality analysis of the studies is summarized in the Table 2. None of the studies reported a blinded assessment of outcome, sample size calculation, criteria inclusion and/or exclusion of data or concealment of treatment allocation. All of the twenty three studies were peer reviewed. Just one of the twenty three studies did not report species/strain of animals in the title or abstract and in the full text. Twenty four studies were in statement of compliance with animal welfare regulations and twenty five reported homogeneity of sample by age or weight of animals. Seventeen studies reported no statement regarding conflicts of interest and nine studies reported randomization of treatment allocation.

Table 2

Quality assessment of the studies through CAMARADES adapted checklist

Study	Items										Quality score
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Aps et al., 2015	X	X	X	X		X					5
Barnes et al., 2007	X	X	X	X							4
Cao, Hao, Wang, 2019	X	X				X	X				4
Copland et al., 2018	X	X	X	X		X					5
Coppola, Conceição, Gil-Turnes, 2005	X	X		X			X				4
Das et al., 2016	X	X	X	X		X					5
De Souza et al., 2014	X	X	X	X		X					5
Duc et al., 2003	X	X		X							3
Esparza-Gonzalez, Troy, Izzo, 2014	X	X	X	X							4
Huang et al., 2010	X	X	X	X							4
Huang et al., 2019	X	X	X	X		X					5
Isticato et al., 2013	X	X	X	X		X					5
Jiang et al., 2019	X	X	X	X		X	X				6
Lee et al., 2020	X	X	X	X		X	X				6
Liang et al., 2013	X	X	X	X			X				5
Maubrigades et al., 2020	X	X	X	X		X	X				6
Mou et al., 2016	X	X	X	X		X	X				6
Nascimento et al., 2012	X		X	X							3
Reljic et al., 2013	X	X	X	X		X					5
Roos et al., 2012	X	X	X	X			X				5
Roos et al., 2018	X	X	X	X		X	X				6
Santos et al., 2018	X	X	X	X							4
Santos et al., 2020a	X	X	X	X		X					5
Santos et al., 2020b	X	X	X	X		X					5
Song et al., 2012	X	X	X								3
Wu et al., 2017	X	X	X	X		X					5
Yang et al., 2020	X	X	X	X		X					5

4. Discussion

A systematic review was carried out on studies using spores of *Bacillus* species as vaccine adjuvants. To our knowledge, this is the first systematic review that analyses the effect of *Bacillus* spores administered by different routes as adjuvants in several viral, bacterial and parasitic experimental vaccines in animal model. We found that the spores enhanced the immunogenicity of the vaccines and improved both humoral and cellular immune response by different means when administered in the host, including antibody production, proliferation of immune cells and expression of stimulatory molecules such as cytokines.

One study was found testing *Bacillus atrophaeus* spores and all the last studies tested or *B. toyonensis* or, mainly, *B. subtilis* spores. *B. atrophaeus* is closely related to *B. subtilis* and has applications in the pharmaceutical, food and biodefense industries, but studies concerning

its efficacy as vaccine adjuvants are still not frequently conducted and require further analysis, although are considered promising [39]. *Bacillus subtilis* is one of the best characterized *Bacillus* species and has an indisputable safety history based on its wide commercial use as probiotics for humans and animals, receiving GRAS status (Generally Recognized as Safe) by the American Food and Drug Administration [40, 41], whereas *B. toyonensis* has also been used in animal feed for several decades and its safety has been proven recently in relation to the transfer of antibiotic resistance genes and enterotoxin production [42, 43].

The review was conducted evaluating the two main approaches for the use of spores as a delivery system for vaccine antigens. Most of the studies were found using the non-recombinant approach than the recombinant approach. This fact can be expected and may be related to the efficacy of the two approaches, since the non-recombinant method is significantly more efficient compared to the recombinant method, because it allows to use up to 70 times less spores to deliver an equivalent amount of antigen, besides avoiding the construction of recombinant strains and the release of genetically modified bacteria in the environment [25]. Also, it enables the presentation of proteins in their native form, providing a more adequate activation of the immune system [25, 44].

It was observed that most of the found studies administered the spores through the mucosa. The mucosal tissues are the main entry for pathogenic microorganisms such as viruses, fungi and bacteria, and therefore are an ideal target for vaccination [45]. Mucosal vaccines are capable of providing protection at different mucosal tissues and also in systemic levels in the host, with production of sIgA and total IgG antibodies, in addition to the production of cytokines and recruitment of immune system cells [46, 47]. As observed in the studies, the spores administered by mucosal route induced an increase in the levels of IgA, IgG, in addition to an increase in cytokine secretion levels. In this regard, spores appear as a promising alternative to improve the effectiveness of mucosal vaccines, since besides its adjuvant

properties, they are capable of resisting low pH conditions and passage through the gastrointestinal tract [48].

We found some studies that submitted the vaccinated animals to pathogenic challenge. The animals vaccinated with formulations containing spores presented an increase of survival rate when challenged with different clostridial toxins [18, 24] and viruses, such as Influenza and GRCV [10, 27, 23], and also presented reduced *M. tuberculosis* loads [26, 32], when compared to the animals that did not receive spores as adjuvants in vaccine formulation. Only one study did not present significant reduction in *M. tuberculosis* loads in the animals vaccinated with spores as adjuvants [31]. This data is an important finding of this work and suggests that the spores when used as vaccinal adjuvants are capable of improving protection rate against several pathogens [18, 24, 10, 26, 27, 32, 23], besides inducing antibody production and cytokine secretion. It is worth mention that the pathogenic challenge is not always possible to be performed with all antigens and animal species, so we did not include this parameter in our inclusion criteria.

Six studies reported a role of the spores in maturation, activation and migration of immune cells and also in proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, indicating a possible mechanism of action by which spores modulate the immune response. The studies showed that APCs, such as macrophages and DCs, can be directly stimulated by spores to produce cytokines and to upregulate stimulatory molecules such as MHC I and II, CD40, CD80 and CD86 [34, 11, 21, 32]. This process may also stimulate the migration of immune cells such as eosinophils, neutrophils and macrophages, regarding the findings of one study [34]. In addition, the interaction of spores with DCs enables the activation of naïve T lymphocytes and their proliferation and differentiation into T CD4⁺ and CD8⁺, amplifying the immune response, as observed in some studies [11, 28].

Some studies tested the spores supplemented orally as probiotics to improve the vaccine's effectiveness. Several reports have shown that probiotic microorganisms have immunomodulatory properties and its spores interact directly with intestinal epithelial cells, M cells and also lamina propria dendritic cells, possibly being recognized by TLR2 or TLR4, stimulating intestinal function and the innate and adaptive immune response [33, 49, 50, 11]. In according to this information, all the studies evaluated showed increased levels of IgG, IgG1, IgG2, IgA and high levels of cytokine transcription/secretion in animals that received the spores, which reinforces the ability of these microorganisms to modulate the immune response of vaccines when administered as probiotics.

In conclusion, this systematic review shows that *Bacillus* spores are capable of improving vaccine efficacy. When spores were administered, they were able to improve the effectiveness of the vaccines, inducing the development of humoral and cellular immune response with antibodies and cytokine production, in addition to stimulation and proliferation rate of immune cells. Therefore, spores can be used as adjuvants and there is sufficient evidence from the studies in our review to suggest this strategy is worth pursuing. However, more studies are necessary to elucidate and explore the mechanisms of action by which spores modulate the immune response.

Declaration of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Author contributions

Funding

This study was financed in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) - Brazil - Finance Code 001 and the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) for F.P.L.L. scholarship.

References

- [1] Greenwood B. The contribution of vaccination to global health: past, present and future. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biol Sci.* 2014;369. doi:10.1098/rstb.2013.0433.
- [2] Lee S, Nguyen MT. Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. *Immune Netw.* 2015;15(2):51-57. doi: 10.4110/in.2015.15.2.51.
- [3] D'Amico C, Fontana F, Cheng R, Santos HA. Development of vaccine formulations: past, present, and future. *Drug Deliv Transl Res.* 2021 Feb 17:1–20. doi: 10.1007/s13346-021-00924-7.
- [4] Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol.* 2009;30(1):23–32. doi:10.1016/j.it.2008.09.006.
- [5] Mbow ML, De Gregorio E, Valiante NM, Rappuoli R. New adjuvants for human vaccines. *Curr Opin Immunol.* 2010;22(3):411–416. doi:10.1016/j.coi.2010.04.004.
- [6] Reed SG, Orr MT, Fox CB. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat Med.* 2013 Dec;19(12):1597-608. doi: 10.1038/nm.3409.
- [7] Shah RR, Hassett KJ, Brito LA. Overview of Vaccine Adjuvants: Introduction, History, and Current Status. *Methods Mol Biol.* 2017;1494:1-13. doi: 10.1007/978-1-4939-6445-1_1.
- [8] Cutting SM. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol.* 2011;28(2):214–220. doi:10.1016/j.fm.2010.03.007.
- [9] Nascimento LO et al. *Bacillus atrophaeus* inactivated spores as a potential adjuvant for veterinary rabies vaccine. *Vaccine.* 2012;30(23):3351–3354. doi:10.1016/j.vaccine.2012.03.029.
- [10] Song M et al. Killed *Bacillus subtilis* spores as a mucosal adjuvant for an H5N1 vaccine. *Vaccine.* 2012;30(22):3266–3277. doi:10.1016/j.vaccine.2012.03.016.
- [11] de Souza RD et al. *Bacillus subtilis* spores as vaccine adjuvants: further insights into the mechanisms of action. *PLoS One.* 2014; 9(1):e87454. doi:10.1371/journal.pone.0087454.
- [12] Santos FDS, Menegon YA, Piraine REA, Rodrigues PRC, Cunha RC, Leite FPL. *Bacillus toyonensis* improves immune response in the mice vaccinated with recombinant antigen of bovine herpesvirus type 5. *Benef Microbes.* 2018;9(1):133–142. doi:10.3920/BM2017.0021.
- [13] Santos FDS et al. A probiotic treatment increases the immune response induced by the nasal delivery of spore-adsorbed TTFC. *Microb Cell Fact.* 2020;19(1):42. doi:10.1186/s12934-020-01308-1.
- [14] Istatico R, Ricca E. Spore Surface Display. *Microbiol Spectr.* 2014 Oct;2(5). doi: 10.1128/microbiolspec.TBS-0011-2012.
- [15] Yang Y et al. Recombinant HcGAPDH Protein Expressed on Probiotic *Bacillus subtilis* Spores Protects Sheep from *Haemonchus contortus* Infection by Inducing both Humoral and Cell-Mediated Responses. *mSystems.* 2020;5(3):e00239-20. doi: 10.1128/mSystems.00239-20.
- [16] Maubrigades LR, Santos FDS, Gonçalves VS, Rodrigues PRC, Leite FPL. Association of *Bacillus toyonensis* spores with alum improves bovine herpesvirus 5 subunit vaccine immune response in mice. *Vaccine.* 2020;38(51):8216-8223. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.10.066.

- [17] Ramos-Hryb AB et al. Protocol for a systematic review and meta-analysis of data from preclinical studies employing forced swimming test: an update *BMJ Open Science*. 2019;3:e000043. doi: 10.1136/bmjos-2017-000043.
- [18] Duc le H, Hong HA, Fairweather N, Ricca E, Cutting SM. Bacterial spores as vaccine vehicles. *Infect Immun*. 2003 May;71(5):2810-8. doi: 10.1128/iai.71.5.2810-2818.2003.
- [19] Das K, Thomas T, Garnica O, Dhandayuthapani S. Recombinant *Bacillus subtilis* spores for the delivery of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B-CFP10 secretory antigens. *Tuberculosis (Edinb)*. 2016 Dec;101S:S18-S27. doi: 10.1016/j.tube.2016.09.016.
- [20] Wu Z et al. Comparative analysis of immune effects in mice model: *Clonorchis sinensis* cysteine protease generated from recombinant *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* spores. *Parasitol Res*. 2017 Jul;116(7):1811-1822. doi: 10.1007/s00436-017-5445-7.
- [21] Mou C, Zhu L, Yang J, Xu W, Cheng X, Yang Q. Immune Responses Induced by Recombinant *Bacillus subtilis* Expressing the Hemagglutinin Protein of H5N1 in chickens. *Sci Rep*. 2016 Dec 16;6:38403. doi: 10.1038/srep38403.
- [22] Cao YG, Hao Y, Wang L. A *Bacillus*-based Coxsackie virus A16 mucosal vaccine induces strong neutralizing antibody responses. *Cent Eur J Immunol*. 2019;44(1):1-6. doi: 10.5114/ceji.2019.84009.
- [23] Jiang H et al. Oral delivery of *Bacillus subtilis* spores expressing grass carp reovirus VP4 protein produces protection against grass carp reovirus infection. *Fish Shellfish Immunol*. 2019 Jan;84:768-780. doi: 10.1016/j.fsi.2018.10.008.
- [24] Huang JM, Hong HA, Van Tong H, Hoang TH, Brisson A, Cutting SM. Mucosal delivery of antigens using adsorption to bacterial spores. *Vaccine*. 2010 Jan 22;28(4):1021-30. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.10.127.
- [25] Isticato R et al. Non-recombinant display of the B subunit of the heat labile toxin of *Escherichia coli* on wild type and mutant spores of *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact*. 2013 Oct 29;12:98. doi: 10.1186/1475-2859-12-98.
- [26] Reljic R et al. Mucosal vaccination against tuberculosis using inert bioparticles. *Infect Immun*. 2013 Nov;81(11):4071-80. doi: 10.1128/IAI.00786-13.
- [27] Liang J, Fu J, Kang H, Lin J, Yu Q, Yang Q. Comparison of 3 kinds of Toll-like receptor ligands for inactivated avian H5N1 influenza virus intranasal immunization in chicken. *Poult Sci*. 2013 Oct;92(10):2651-60. doi: 10.3382/ps.2013-03193.
- [28] Huang L et al. Upregulation of CD4⁺CD8⁺ memory cells in the piglet intestine following oral administration of *Bacillus subtilis* spores combined with PEDV whole inactivated virus. *Vet Microbiol*. 2019 Aug;235:1-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2019.06.003.
- [29] Lee JE et al. *Bacillus subtilis* spores as adjuvants against avian influenza H9N2 induce antigen-specific antibody and T cell responses in White Leghorn chickens. *Vet Res*. 2020 May 24;51(1):68. doi: 10.1186/s13567-020-00788-8.
- [30] de Souza RD et al. *Bacillus subtilis* spores as vaccine adjuvants: further insights into the mechanisms of action. *PLoS One*. 2014 Jan 27;9(1):e87454. doi: 10.1371/journal.pone.0087454.
- [31] Esparza-Gonzalez SC, Troy AR, Izzo AA. Comparative analysis of *Bacillus subtilis* spores and monophosphoryl lipid A as adjuvants of protein-based mycobacterium tuberculosis-based vaccines: partial requirement for interleukin-17a for induction of protective immunity. *Clin Vaccine Immunol*. 2014 Apr;21(4):501-8. doi: 10.1128/CVI.00622-13.
- [32] Copland A et al. Mucosal Delivery of Fusion Proteins with *Bacillus subtilis* Spores Enhances Protection against Tuberculosis by *Bacillus Calmette-Guérin*. *Front Immunol*. 2018 Mar 12;9:346. doi: 10.3389/fimmu.2018.00346.
- [33] Barnes AG, Cerovic V, Hobson PS, Klavinskis LS. *Bacillus subtilis* spores: a novel microparticle adjuvant which can instruct a balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen. *Eur J Immunol*. 2007;37(6):1538–1547. doi:10.1002/eji.200636875.

- [34] Aps LR, Diniz MO, Porchia BF, Sales NS, Moreno AC, Ferreira LC. *Bacillus subtilis* spores as adjuvants for DNA vaccines. *Vaccine*. 2015;33(20):2328–2334. doi:10.1016/j.vaccine.2015.03.043.
- [35] Santos FDS et al. *Bacillus toyonensis* BCT-7112^T transient supplementation improves vaccine efficacy in ewes vaccinated against *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *J Appl Microbiol*. 2021 Mar;130(3):699-706. doi: 10.1111/jam.14814.
- [36] Coppola MM, Conceição FR, Gil-Turnes C. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. Toyoi on the humoral and cellular response of mice to vaccines. *Food and Agricultural Immunology*. 2005;16(3):213-219.
- [37] Roos TB, de Lara AP, Dummer LA, Fischer G, Leite FP. The immune modulation of *Bacillus cereus* var. Toyoi in mice immunized with experimental inactivated Bovine Herpesvirus Type 5 vaccine. *Vaccine*. 2012;30(12):2173-2177. doi:10.1016/j.vaccine.2012.01.007.
- [38] Roos TB, de Moraes CM, Sturbelle RT, Dummer LA, Fischer G, Leite FPL. Probiotics *Bacillus toyonensis* and *Saccharomyces boulardii* improve the vaccine immune response to Bovine herpesvirus type 5 in sheep. *Res Vet Sci*. 2018 Apr;117:260-265. doi: 10.1016/j.rvsc.2017.12.022.
- [39] Sella SR, Vandenberghe LP, Soccol CR. Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. *Microbiol Res*. 2014 Dec;169(12):931-9. doi: 10.1016/j.micres.2014.05.001
- [40] Hong HA, Duc le H, Cutting SM. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol Rev*. 2005 Sep;29(4):813-35. doi: 10.1016/j.femsre.2004.12.001.
- [41] Negri A, Potocki W, Iwanicki A, Obuchowski M, Hinc K. Expression and display of *Clostridium difficile* protein FliD on the surface of *Bacillus subtilis* spores. *J Med Microbiol*. 2013 Sep;62(Pt 9):1379-1385. doi: 10.1099/jmm.0.057372-0.
- [42] Glenwright H, Pohl S, Navarro F, Miro E, Jiménez G, Blanch AR, Harwood CR. The Identification of Intrinsic Chloramphenicol and Tetracycline Resistance Genes in Members of the *Bacillus cereus* Group (*sensu lato*). *Front Microbiol*. 2017 Jan 4;7:2122. doi: 10.3389/fmicb.2016.02122.
- [43] Abdulmawjood A, Herrmann J, Riede S, Jimenez G, Becker A, Breves G. Evaluation of enterotoxin gene expression and enterotoxin production capacity of the probiotic strain *Bacillus toyonensis* BCT-7112T. *PLoS One*. 2019 Apr 25;14(4):e0214536. doi: 10.1371/journal.pone.0214536.
- [44] Istatico R, Ricca E, Baccigalupi L. Spore Adsorption as a Nonrecombinant Display System for Enzymes and Antigens. *J Vis Exp*. 2019;(145). doi: 10.3791/59102.
- [45] Günther J, Seyfert HM. The first line of defence: insights into mechanisms and relevance of phagocytosis in epithelial cells. *Semin Immunopathol*. 2018 Nov;40(6):555-565. doi: 10.1007/s00281-018-0701-1.
- [46] Nizard M, Diniz MO, Roussel H, Tran T, Ferreira LC, Badoual C, Tartour E. Mucosal vaccines: novel strategies and applications for the control of pathogens and tumors at mucosal sites. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(8):2175-87. doi: 10.4161/hv.29269.
- [47] Miquel-Clopés A, Bentley EG, Stewart JP, Carding SR. Mucosal vaccines and technology. *Clin Exp Immunol*. 2019 May;196(2):205-214. doi: 10.1111/cei.13285.
- [48] Sirec T, Strazzulli A, Istatico R, De Felice M, Moracci M, Ricca E. Adsorption of β -galactosidase of *Alicyclobacillus acidocaldarius* on wild type and mutants spores of *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact*. 2012 Aug 3;11:100. doi: 10.1186/1475-2859-11-100.
- [49] Yan F, Polk DB. Probiotics and immune health. *Curr Opin Gastroenterol*. 2011 Oct;27(6):496-501. doi: 10.1097/MOG.0b013e32834baa4d.

- [50] Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab.* 2012;61(2):160-74. doi: 10.1159/000342079.

4.2 Artigo 1 – Association of *Bacillus toyonensis* spores with alum improves bovine herpesvirus 5 subunit vaccine immune response in mice

Artigo publicado na revista *Vaccine*

Association of *Bacillus toyonensis* spores with alum improves Bovine Herpesvirus 5 subunit vaccine immune response in mice

Lucas Reichert Maubrigades ^{a,1}, Francisco Denis Souza Santos ^{a,1}, Vitória Sequeira Gonçalves ^a, Paulo Ricardo Centeno Rodrigues ^b, Fábio Pereira Leivas Leite ^{a, b*}

^a Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, 96160-900 Capão do Leão, RS, Brazil.

^b Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 96160-900 Capão do Leão, RS, Brazil.

* Corresponding author: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, 96160-900 Capão do Leão, RS, Brazil. E-mail: fabio_leite@ufpel.edu.br, fleivasleite@gmail.com (F.P.L. Leite).

¹ These authors contributed equally to this paper.

Abstract

Spores of the genus *Bacillus* are molecules capable of increasing the vaccine adjuvanticity. Bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) is responsible for meningoencephalitis that causes important economic losses in cattle. BoHV-5 glycoprotein D (gD) is a target of vaccine antigen and plays an important role in host cell penetration. The present study aimed to evaluate the adjuvanticity of *Bacillus toyonensis* (B.t) spores, live and heat-killed, associated with a vaccine

formulated with aluminum hydroxide (alum) and the recombinant BoHV-5 glycoprotein D (rgD) in an experimental murine model. Six experimental groups of mice were subcutaneously vaccinated on day 0 and received a booster on day 21 of the experiment, with the following vaccine formulations: rgD (40 µg) + live spores (2×10^9 CFU); rgD + killed spores; rgD + live spores + alum (2.0 mg); rgD + killed spores + alum; rgD + alum, and rgD + PBS. Mice from rgD + live spores group showed an increase in rgD IgG titers from the 21st day until the end of the experiment. The groups of live and killed spores, associated to alum, had similar levels of IgG titers with no significant difference between each other; however, by the 14th and 28th day until the end of the experiment, presented higher IgG titers in comparison to the rgD + alum group. Moreover, increased serum levels of IgG1, IgG2a, and IgG2b were detected in mice that received spores in the vaccine formulation. The spores associated with alum groups showed neutralizing BoHV-5 antibodies and high mRNA transcription of the cytokines IFN- γ (66-fold), IL-17 (14-fold), and IL-12 (2.8-fold). In conclusion, our data demonstrated that the *B. toyonensis* spores, live or killed, associated with alum increased the adjuvanticity for BoHV-5 rgD in mice, suggesting the use of *B. toyonensis* spores as a promising component for vaccine formulations.

1. Introduction

The use of vaccines is one of the most efficient alternatives for prophylaxis and the control of infectious diseases [1]. The vaccines based on recombinant antigens are considered relatively safer owing to their low adverse effects, including local irritations and the risk of reversion to virulence [2]. However, recombinant subunit vaccines are often poorly immunogenic and require additional components to stimulate protective immunity [3]. Adjuvants are an important component of vaccines that are capable of stimulating the immune response against antigens and induce an efficient protective response in the host [2, 4].

Aluminum hydroxide (alum), the first licensed adjuvant, is widely used in animal and human vaccines [5]. It is known to remain at the site of injection and slowly release the antigen over time to be recognized by antigen-presenting cells (APCs), thereby amplifying the immune response of vaccines [6].

Bacillus genus comprises spore-forming bacteria that are widely used as probiotics for animals and humans [7]. Spores of the *Bacillus* genus have been evaluated for their immunomodulatory properties, and several studies have also demonstrated that the spores can confer strong adjuvanticity to vaccines, which are administered via mucosal and parenteral routes [8–13]. *Bacillus toyonensis* is a spore-forming, Gram-positive, non-pathogenic bacterium that has been used as a probiotic in animal feed for the past several decades [14, 15]. Also, several reports have demonstrated the capability of *B. toyonensis* spores in enhancing the effectiveness of conventional and recombinant vaccines in sheep, pigs, and mice, along with its immunomodulatory effects [16–21].

Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) is the causative agent of meningoencephalitis that affects mainly young cattle, with a 100% mortality rate most of the time [22]. This disease is responsible for economic losses, mostly in South American countries, like Brazil and Argentina [23–26]. The glycoprotein D of BoHV-5 (gD) is essential for the binding and penetration of the virus into the host cells and is also one of the main targets of the host immune response, leading to strong humoral and cell-mediated immune responses during infections [27]. In previous studies, our group have showed that the BoHV-5 recombinant glycoprotein D (rgD) used as a vaccinal antigen, and associated with oil-base adjuvants, was able to induce high neutralizing antibodies titers in mice and cattle [27,28]. Thus, the present study aimed to investigate the adjuvanticity of live and killed spores of *Bacillus toyonensis* adsorbed to alum for a recombinant BoHV-5 glycoprotein D vaccine in the murine model.

2. Materials and methods

2.1 Bacterial culture and spore preparation

The *Bacillus toyonensis* BCT-7112^T strain used in this study was obtained from the collection of microorganisms of the Microbiology Laboratory, Biotechnology Center, Federal University of Pelotas (UFPel). The bacterial culture was initially inoculated in Luria-Bertani (LB) broth and incubated at 37 °C for 18 h in an orbital shaker incubator. Sporulation was performed in F medium as previously described [29] for 96 h at 37 °C in an orbital shaker incubator. Following the achievement of 90% sporulation of the bacterial cells (verified by Wirtz-Conklin stain), the sporulated culture was then centrifuged in a Sorvall centrifuge[®] RC-6 plus (Langensfeld, Germany) at 5,000×g for 20 min at 4 °C and suspended later in phosphate-buffered saline (PBS). The final suspension was heat-treated at 68 °C for 3 h to eliminate the vegetative cells. Following this, the *B. toyonensis* spores were purified as the method described previously [30]. After purification, the spore suspension was serially diluted and plated on Brain Heart Infusion (BHI) agar (Neogen, Lansing, MI, USA) and incubated at 37 °C for 24 h. The colonies were then counted and calculated as the titers of colony-forming units (CFU/mL).

2.2 Expression of recombinant glycoprotein D

The BoHV-5 gD was cloned into the *Pichia pastoris* strain KM71H Mut^s, and the resultant BoHV-5 rgD was then expressed, concentrated, and purified as described previously [31]. Briefly, the recombinant clone was inoculated in culture flasks containing buffered glycerol-complex (BMGY) medium (1% yeast extract, 2% peptone, 1.34% yeast nitrogen base, 0.00004% biotin, 1% glycerol, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0) and incubated in an orbital shaker for 24 h at 28 °C with an agitation speed of 150 rpm. The cells were then harvested and resuspended in 1/10 (10%) of the original culture volume of buffered methanol

complex (BMMY) medium (BMGY medium with 0.5% methanol in replacement of 1% glycerol). To induce the expression, 1% of 100% methanol was added for every 24 h; cells were then kept in the same growth conditions described above for 72 h. Cells were harvested later, and the collected supernatant was concentrated with Centriprep 50YM (Millipore). The rgD was then purified by affinity chromatography using both His Trap HP 1 mL columns pre-packed with pre-charged Ni Sepharose and the ÄKTA prime Automated Liquid Chromatography system (GE Healthcare). To monitor the purification process and confirming the rgD expression, SDS-PAGE 12% polyacrylamide gel and Western blot were also performed. The protein concentration was determined by bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Pierce) method, according to the manufacturer's instructions.

2.3 Ethics statement

The mice used in the present study were provided by the animal unit at UFPel. All protocols and procedures were reviewed and approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation (CEEAA No. 1981) of the UFPel. The CEEAA of UFPel is accredited by the Brazilian National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA).

2.4 Vaccine preparations and mice immunizations

Female outbred Swiss mice, age 6 weeks were divided into six groups of 10 animals each. The mice were subcutaneously vaccinated on day 0 and received a booster on day 21 of the experiment, by injecting 0.2 mL of the vaccine formulated with 40 µg of rgD as follows: the rgD + PBS group with rgD plus PBS; the rgD + killed spores group with rgD plus 2×10^9 of heat-killed spores (at 121 °C for 30 min); and the rgD + live spores group with rgD plus 2×10^9 of live spores. The rgD + alum group with rgD adjuvanted with 10% alum (Al (OH)₃, Sigma, St. Louis, Missouri, US), pH 7.0. The rgD + live spores + alum group was given rgD plus 2×10^9 of live spores adjuvanted with 10% alum, whereas the rgD + killed spores + alum

group was given rgD plus 2×10^9 of heat-killed spores adjuvanted with 10% alum. Blood samples were then collected by the submandibular puncture on days 0, 14, 21, 28, 35, and 42. Following the collection, the serum samples were separated, labeled, and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further analysis.

2.5 Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

2.5.1 Total serum IgG antibodies against rgD

Indirect ELISA was performed according Dummer et al. [27], with few modifications. Briefly, 96-well microtiter plates were coated with 50 ng of rgD per well and incubated for overnight at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The plates were then washed with PBS-T (phosphate-buffered saline with 0.05% of Tween[®] 20). The serial 2-fold dilutions of the individual serum samples were then plated and incubated for 1 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. After three washes, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) with 1:4000 dilution was added, followed by incubation at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 h. Reactions were then visualized with o-Plenylenediamine dyhydrochloride (OPD) (Sigma), stopped eventually using $2\text{N H}_2\text{SO}_4$, and analyzed at an optical density (OD) of 492 nm using an EZ Read 400 microplate reader (Biochrom, UK). Results were expressed as the reciprocal of the highest dilution resulting in a reading of three standard deviations above the value of the negative control serum.

2.5.2 IgG isotyping against rgD

The IgG isotypes (IgG1, IgG2a, and IgG2b) were evaluated by ELISA using pooled serum samples of the experimental groups. Briefly, the plates were coated with 50 ng of rgD per well as described previously in Section 2.5.1. The pooled serum samples serially 2-fold dilutions were added in triplicate, and ELISA was performed according to the instructions of the Mouse Monoclonal Isotyping Reagents kit (Sigma-Aldrich). The results were expressed as

the reciprocal of the highest dilution resulting in a reading of three standard deviations above the value of the negative control serum.

2.6 Virus neutralization test (VNT)

Serum samples collected on day 42 of the experiment were tested for the presence of neutralizing antibodies against BoHV-5 using the virus neutralization test, as described previously by Fischer et al. [32]. Briefly, each serum was serially diluted (2-fold) in quadruplicate, beginning at 1:2 until 1:256 in minimum essential medium (MEM). A suspension of BoHV-5 virus containing 100 cell culture infectious dose 50% (CCID₅₀) was then added and incubated for 1 h at 37 °C in a 5% CO₂ environment. Approximately 3×10^4 of Madin Darby bovine kidney cells (MDBK, originally ATCC CCL22) per well were then added and incubated until 100 CCID₅₀ was observed in the control cells. The absence of cytopathic effect (CPE) resulted from the presence of neutralizing antibodies. Antibodies titers were then calculated by the Behrens and Kärber statistical method and expressed as the reciprocal of the highest dilution capable of neutralizing 100 CCID 50% of the virus.

2.7 Spleen cells cultures

Mice from all the experimental groups were euthanized on day 42 of the experiment by an overdose of isoflurane, which was consistent with the recommendations of the American Veterinary Medical Association (AVMA) Guidelines for Euthanasia [33], followed by spleen collection and maceration. The spleen cells (2×10^6) were cultured in 1 mL of RPMI 1640 medium (Gibco) containing 10% fetal bovine serum (FBS) along with antibiotic and antifungal agents (10,000 IU/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin, and amphotericin B 25 mg/mL) (Gibco) in 24-well plates (Kasvi, Taiwan, China), and incubated for 24 h at 37 °C in a 5% carbon dioxide (CO₂) greenhouse. After 24 h, the medium was renewed, and the cells were stimulated using 10 µg rgD, 10 µg concanavalin A (ConA, Sigma-Aldrich), and RPMI 1640

medium, followed by 18 h incubation under the same conditions as mentioned previously, wherein the ConA and the medium were used as positive and negative controls, respectively. Following incubation, the supernatant was discarded, the cells were collected with TRIzol[®] reagent (Sigma-Aldrich), and stored at -70°C until further RNA extraction.

2.8. RNA isolation, cDNA synthesis, and qPCR

The RNA was extracted using the TRIzol method, according to the manufacturer's instructions. Firstly, about 400 ng concentration of RNA was used for the synthesis of cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. A quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was then performed on a CFX96TM Real-Time System platform (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using specific primers for β -actin, GAPDH, IL-4, IL-10, IL-17, IL-12, and IFN- γ . The primer sequences of all the used genes in this PCR experiment have been described previously [27, 34]. The reaction efficiency for each of the primer pair was calculated using a two-fold dilution series on a cDNA sample. The standard curves were then represented as the semi-log regression line plot of the C_t value vs. log of the relative input cDNA concentration, according to that described previously [35]. An efficiency of 97.9%–106.9% was considered acceptable and therefore, the primers with efficiencies within these limits were included in the experiment. β -Actin was used as an endogenous reference gene and animals in pre-immune conditions were used as calibrators. The qPCR reactions were performed using 1 μL of cDNA (synthesized from 400 ng of RNA), 6.25 μL of GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 0.25 μM of each primer, and 4.25 μL of RNase-free water (Sigma-Aldrich), in a total reaction volume of 12.5 μL . The temperature conditions were maintained as denaturation at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 60°C for 60 s, extension at 72°C for 60 s, and a final extension at 72°C for 5 min. All the samples

were analyzed in triplicate. The $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method was used to determine the relative amount of mRNA for each gene with β -actin as the reference gene, according to described previously [36].

2.9 Statistical Analysis

The data obtained were analyzed using the GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software, CA, USA). The values of total serum ELISA antibody titers and isotype of each experimental group were then transformed to $\log_{10}$ and submitted to analysis of variance (two-way ANOVA), followed by Tukey's multiple comparisons test. The differences found in serum neutralizing antibody titers and relative cytokine mRNA transcription were evaluated using one-way ANOVA, followed by Dunnett's test. Data were compared with each other, and a statistical difference was considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Total IgG dynamics

All the experimental groups responded to vaccination with increased specific antibody production against rgD (Fig. 1). During all the experimental days, except on day 14 after the first vaccination, the group that received rgD associated with live spores showed a significant higher IgG level ($p < 0.05$) from the day 21 until the end of the experimental period, in comparison to the group vaccinated with the rgD associated with killed spores and the rgD + PBS group (Fig. 1A). There was no difference among the groups that were vaccinated with the rgD associated with killed spores and the rgD associated with PBS only. The rgD + live spores + alum group showed significant higher IgG levels ($p < 0.05$) when compared to the rgD + alum group, during all evaluated days, of 9.9-fold increase on 14th day after the first vaccination, 4.6-fold increase on day 21, 7.5-fold increase on day 28, 6.2-fold increase on day 35 and 2.6-fold increase on day 42 (Fig. 1B). The rgD + killed spores + alum group also showed significant higher IgG levels ($p < 0.05$) on days 14, 21 and 28, and, fourteen days after the vaccine boost,

a maximal response of 12.1-fold increase was observed on day 35, when compared to the rgD + alum group (Fig. 1B). The same trend was observed for total IgG dynamic between live spores and killed spores associated with alum, with significant difference ($p < 0.05$) on day 14, when rgD + live spores + alum group presented higher IgG levels compared to rgD + killed spores + alum group; and on day 42, when rgD + killed spores + alum group overtakes with higher levels compared to rgD + live spores + alum group (Fig. 1B).

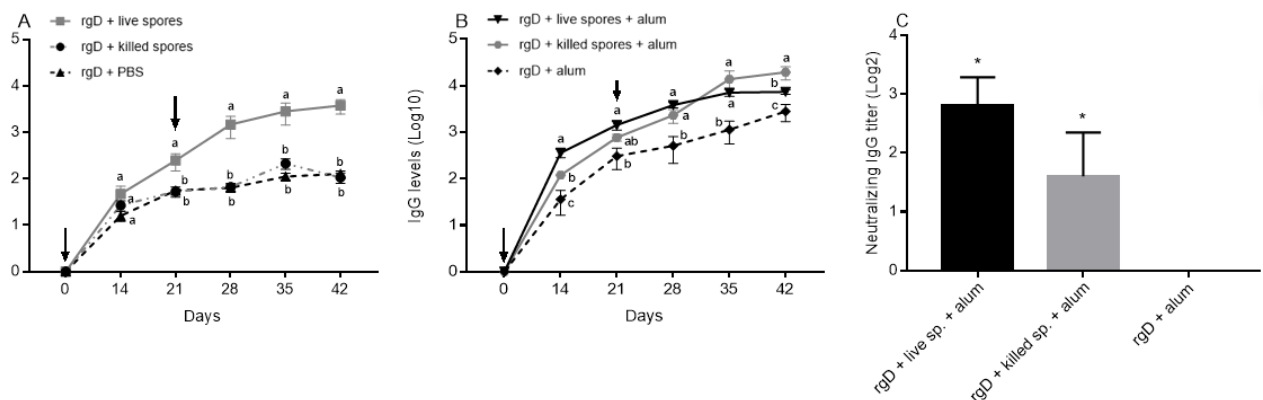


Fig. 1. Analysis of serum IgG dynamics. (A) (B) Total IgG levels determined by indirect ELISA of mice vaccinated with rgD of BoHV-5 and *B. toyonensis* BCT-7112^T spores plus/or alum by subcutaneous administration route. The data represent the mean $\pm$ standard error (S.E.M) of Log₁₀ transformed data and are expressed as the reciprocal of the highest dilutions. The statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. The arrows indicate vaccination. Similar letters indicate no statistical difference ($p > 0.05$), while different letters indicate a statistical difference ($p < 0.05$) between the experimental groups. (C) Titers of neutralizing antibodies against BoHV-5 in mice vaccinated with rgD and different formulations of *B. toyonensis* BCT-7112^T spores plus/or alum. The data represent the mean titers of neutralizing antibodies ($\pm$ standard error) expressing the reciprocal of the highest dilution that completely inhibited virus-induced CPE. The statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Dunnett's test. Asterisks

(*) indicate a statistically significant difference ($p < 0.05$) between the experimental groups and the control group (rgD + alum).

3.2 Neutralizing antibodies by VNT

The titers of neutralizing antibodies against BoHV-5 were investigated on day 42 of the experiment (Fig. 1C). The vaccines with a combination of rgD with live and killed spores associated to alum (rgD + live spores + alum and rgD + killed spores + alum groups) stimulated neutralizing antibodies titers ($p < 0.05$). The other groups (rgD + live spores, rgD + killed spores, and rgD + alum) did not produce detectable neutralizing antibodies.

3.3 IgG isotype dynamics

When evaluating IgG isotypes, we observed that the rgD + live spores group showed significantly higher levels of IgG1 ($p < 0.05$) in all timed-points when compared to the rgD + PBS group, with a 32-fold increase on the 14th and 21st day after the first vaccination and maintaining a 16-fold increase in the remaining experimental days (28, 35 and 42) (Fig. 2A). Also, an expressive increase in IgG2a levels was observed after the vaccine boost, on day 28 (128-fold increase) (Fig. 2C), and in IgG2b levels on day 28 (64-fold increase) and 35 (128-fold increase), when compared with the rgD + PBS group (Fig. 2E).

The rgD + live spores + alum group showed significant higher IgG1 levels ($p < 0.05$) of 4, 8 and 4-fold increase on days 21, 28 and 35, respectively, when compared to rgD + alum group (Fig. 2B). This group also had significantly increased ($p < 0.05$) IgG2a levels on days 28 (16-fold increase), 35 (8-fold increase) and 42 (4-fold increase) (Fig. 2D), and increased IgG2b levels of 8-fold increase on 28th day and 4-fold increase on 35th and 42nd day, when compared to the rgD + alum group (Fig. 2F). The rgD + killed spores + alum group also showed an increase in IgG1 levels after the vaccine boost, on days 28 and 35, of 4-fold increase when compared to rgD + alum group (Fig. 2B). In the same way, after the boost on days 28, 35 and

42, this group presented a 4, 8 and 4-fold increase, respectively, in IgG2a levels, in addition to an increase in IgG2b levels on these same days (28, 35 and 42), maintaining a 4- fold increase (Fig. 2D and 2F).

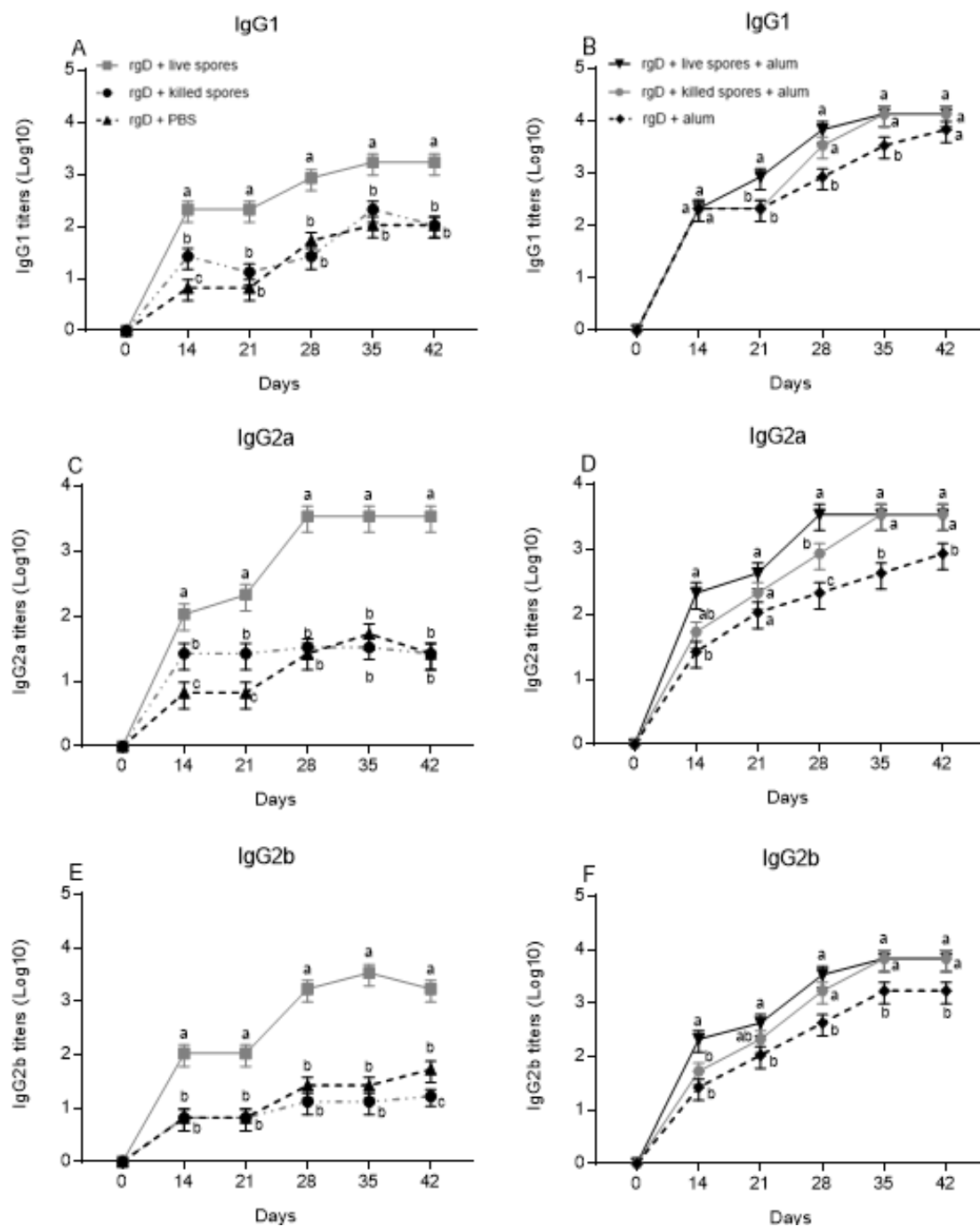


Fig. 2. IgG isotype profile. IgG1 levels (A, B), IgG2a levels (C, D), and IgG2b levels (E, F) determined by indirect ELISA of serum from mice vaccinated with rgD of BoHV-5 and *B. toyonensis* BCT-7112^T spores plus/or alum by subcutaneous administration route. The data represent the mean $\pm$ standard error (S.E.M) of Log₁₀ transformed data and are expressed as the reciprocal of the highest dilutions. The statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Similar letters indicate no statistical difference ($p > 0.05$), while different letters indicate a statistical difference ($p < 0.05$) between the experimental groups on the same day.

3.4 Cytokine mRNA transcription

The cytokine mRNA transcription levels in the spleen cells of all the mice from experimental groups were assessed by qPCR on the 42nd day of the experiment. These spleen cells were stimulated with rgD and showed a distinct mRNA transcription profile of studied cytokines. The groups that had spores (live or killed) on its vaccine formulation had high mRNA transcription of Th1-type cytokines (IFN- γ , IL-12 and IL-17). The group that received rgD associated with live spores, in comparison with the rgD + PBS group, showed relatively low IL-4 transcription values, even though these differed with a 2.6-fold increase statistically ($p < 0.05$) (Fig. 3A), and also showed a significant ($p < 0.05$) higher mRNA transcription levels of IFN- γ (19.2-fold increase) when compared with rgD + PBS group (Fig. 3E). We observed that the rgD + alum group also presented relative low mRNA transcription levels of IL-4 and IL-10, but statistically different ($p < 0.05$) when compared to the groups that received rgD associated with live and killed spores adjuvanted with alum (Fig. 3A and 3B). Moreover, the group that received rgD associated with the live spores adjuvanted with alum showed a significant ($p < 0.05$) mRNA transcription of IL-12 (2.8-fold increase), IL-17 (14.3-fold increase), and IFN- γ (66.4-fold increase) when compared with the group that received only rgD plus alum (Fig. 3C, D, and E). We also observed higher levels ($p < 0.05$) of mRNA transcription

in the group that received rgD associated with killed spores adjuvanted with alum, for IL-12 (2.9-fold increase), IL-17 (4-fold increase), and IFN- γ (57.5-fold increase) when compared with the group that received only rgD plus alum (Fig. 3C, D, and E).

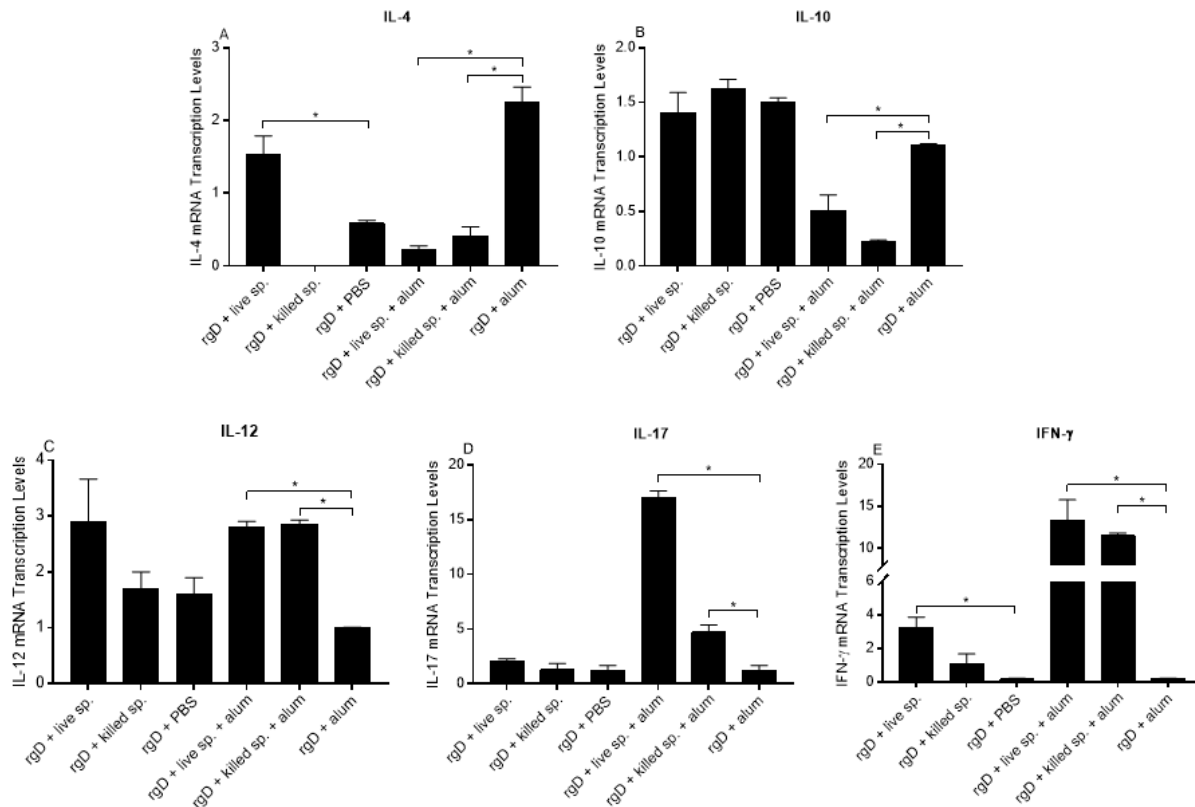


Fig. 3. qPCR transcription for IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 and IFN- γ mRNA. The data represent the mean $\pm$ S.E.M of IL-4 (A), IL-10 (B), IL-12 (C), IL-17 (D) and IFN- γ (E) mRNA transcription in splenocytes from mice vaccinated with rgD of BoHV-5 and *B. toyonensis* BCT-7112^T spores plus/or alum by subcutaneous administration route. The splenocytes were stimulated *in vitro* with BoHV-5 rgD. The relative cytokine mRNA transcription was determined by the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. The statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. Asterisks (*) indicate a statistical difference (p < 0.05) between the experimental groups.

4. Discussion

Spores of the *Bacillus* genus bacteria, such as *B. subtilis* and *B. toyonensis*, have a long history of their use as probiotics in humans and animals through oral supplementation and have earlier been evaluated for their immunomodulatory properties in conventional, recombinant and mucosal vaccines [14, 18, 20, 21, 37]. It is known that the spores act by directly activating APCs, particularly DCs, such as Langerhans cells residing in epithelial tissue [12]. In fact, DCs that were stimulated with *B. subtilis* spores showed a positive regulation of major class histocompatibility I and II (MHC class I and II) and co-stimulatory molecules, such as CD40, CD25 and CD86 [8, 12, 13]. In our study, the groups that received the *B. toyonensis* spores in the vaccine formulation had higher levels of total IgG in serum, suggesting that the spores amplified the specific immune response against rgD.

The higher levels of IgG1, IgG2a and IgG2b isotypes were observed in the group that received only the live spores associated with rgD in comparison to the groups that received only inactivated spores associated with rgD and rgD plus PBS. When added to the alum adjuvant, the groups with live or inactivated spores showed the same dynamics tendency of IgG1, IgG2a and IgG2b titers, with statistical difference only in some timed points. It is worth noting that the vaccination with live spores only induced similar results when compared to the group that received live spores plus alum in the vaccine formulation. This information suggested that the live spores were able to modulate the levels of these isotypes, accelerating the vaccine immune response and inducing a predominant polarizing Th1 response, which corroborated with the previous experiments [9, 21, 37]. In mice, the IgG2a and IgG2b subclasses are the most proinflammatory IgG molecules, considered the most potent isotypes in activating effector mechanisms in the immune response against viruses [38, 39].

Interestingly, this effect was even higher when the live and inactivated spores were associated to alum. Vaccine formulations containing live and inactivated spores adsorbed to alum were found to be the most efficient one to amplify the humoral and cellular immune

responses of animals, in addition to the fact that these groups have shown detectable neutralizing antibodies against the virus. In a previous study, we tested the BoHV-5 rgD as a vaccine formulation in association with alum in cattle, however, these association do not induce significant serum neutralizing antibodies [28]. So, in the present work, we decided to evaluate the addition of spores into the vaccine formulation in order to improve the vaccine immune response. Alum is traditionally used as an adjuvant in several human and animal vaccines [4]. It is capable of promoting a slow release of the antigen to be recognized by APCs, especially DCs [5], in addition to stimulate the cells of the innate immune system by activating the NLRP3 inflammasome pathway and inducing the differentiation of naive T lymphocytes into Th2 lymphocytes [40, 41]. Therefore, the association of alum with spores may have increased their adjuvanticity, prolonging the vaccine response, promoting a better interaction between follicular helper T cells (Tfh) and B cells, thereby, consequently inducing neutralizing IgG antibodies production. After vaccination against a viral agent, neutralizing antibodies may be sufficient to protect or control future infections [42].

The cytokine mRNA transcription in splenocytes was evaluated on the 42nd day of the experiment. As predicted, the group that received only the rgD adsorbed to alum showed higher levels of mRNA of the cytokines IL-4 and IL-10 when compared to the animals that received the vaccine containing spores adsorbed to alum, although the levels were observed to be relatively low. The production of IL-4 may reflect the central role of alum in directing a polarizing Th2-type response [43], and in suppressing the Th1-type response, by stimulating the secretion of IL-10 by macrophages and DCs [44].

IL-12 is a cytokine responsible for inducing IFN- γ expression, stimulation of NK cells, and differentiation of naïve T lymphocytes into Th1 lymphocytes [45, 46]. A significant increase in the IL-12 mRNA transcription was observed in the splenocytes of mice that received rgD associated with live and inactivated spores adsorbed to alum. Since alum is an inefficient

polarizer of responses mediated by Th1 lymphocytes and IL-12 [47], the spores can play an additional role in this pathway, through the activation of dendritic cells via TLR receptors (e.g., TLR2, TLR4, and TLR8) and stimulating the expression of co-stimulatory molecules and cytokine secretion [12, 48, 49].

The presence of IFN- γ characterizes a Th1-type cell response and it is fundamental on the immune responses against viruses, as it increases the expression of MHC I and II, lymphocyte recruitment, and macrophage activation [50–52]. A significant increase in the IFN- γ mRNA transcription was observed in the splenocytes of mice vaccinated with rgD associated with live spores and in the groups that were vaccinated with formulations with live and inactivated spores adsorbed to alum. In addition, the modulation of IFN- γ by *B. toyonensis* spores corroborated with the previous observations of experiments using spores as adjuvants to parenteral and mucosal vaccines [8, 9, 12, 21, 37]. IL-17 is a potent proinflammatory cytokine produced mainly by Th17 cells [53], which plays an important role in the development of humoral immune response, stimulating the formation of germinal centers and isotypes production of IgG1, IgG2a and IgG2b [54]. A significant increase in the IL-17 mRNA transcription levels was observed in splenocytes of mice that received live spores adsorbed to alum (14.3-fold increase) and inactivated spores adsorbed to alum (4-fold increase), in addition to significant levels of IgG1, IgG2a and IgG2b.

Several studies using inactivated spores of bacteria in the experimental vaccine formulations have been already related in literature. The *B. subtilis* inactivated spores were evaluated as an adjuvant in an experimental recombinant HIV vaccine containing the p24 protein, while *B. atrophaeus* inactivated spores were tested in a rabies virus vaccine, and in both cases, they stimulated high neutralizing antibodies titers against the viruses [10, 12]. Curiously, the vaccine containing only *B. toyonensis* inactivated spores was not able to stimulate the production of significant IgG levels. One possible explanation is that the spore

inactivation process might have caused the denaturation of surface epitopes and consequently changing its structure, regarding that spores contain more than 70 proteins composing the protein layer [55]. However, it was out of the scope of this present study.

In contrast, when inactivated spores were adsorbed to alum, the vaccine was capable of modulating the humoral and cellular immune response, presenting rising IgG levels after the boost that even differed statistically on day 42 of those from the group that received live spores adsorbed to alum in the vaccine formulation. This fact suggested that alum is necessary for inactivated spores to exercise its adjuvant effect and that spores need to be viable to exercise their adjuvanticity. However, additional tests need to be performed to better understand the possible mechanisms involved. This information is relevant since spores are inactivated and associated to the safe and most used adjuvant in animal and human vaccines. In summary, our results showed that mice that received the vaccine containing live spores or live and killed spores adsorbed to alum showed significantly higher serum IgG levels, suggesting that the spores were able to amplify the specific immune response against rgD. Thus, the *B. toyonensis* spores presented adjuvant properties, indicating that they have utility for a potential alternative to increase the immunogenicity of vaccines.

Declaration of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Author contributions

LRM and FDSS contributed equally to this work. FDSS, LRM together with FPLL designed the study and wrote the manuscript. LRM, FDSS, VSG, and PRCR performed the experiments and analyses. All authors contributed to and revised the manuscript.

Funding

This study was financed in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) - Brazil - Finance Code 001 and the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) for F.P.L.L. scholarship.

References

- [1] Greenwood, B. The contribution of vaccination to global health: past, present and future. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biol Sci.* 2014;369. doi:10.1098/rstb.2013.0433
- [2] Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol.* 2009;30(1):23–32. doi:10.1016/j.it.2008.09.006.
- [3] Mbow ML, De Gregorio E, Valiante NM, Rappuoli R. New adjuvants for human vaccines. *Curr Opin Immunol.* 2010;22(3):411–416. doi:10.1016/j.coi.2010.04.004.
- [4] Krieg A. Toll-free vaccines? *Nat Biotechnol.* 2007;25:303–305. doi: 10.1038/nbt0307–303.
- [5] Leroux-Roels G. Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response. *Vaccine.* 2010;28 Suppl 3:25–36. doi:10.1016/j.vaccine.2010.07.021.
- [6] Ghimire TR, Benson RA, Garside P, Brewer JM. Alum increases antigen uptake, reduces antigen degradation and sustains antigen presentation by DCs in vitro. *Immunol Lett.* 2012;147(1–2):55–62. doi:10.1016/j.imlet.2012.06.002.
- [7] Cutting SM. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol.* 2011;28(2):214–220. doi:10.1016/j.fm.2010.03.007.
- [8] Barnes AG, Cerovic V, Hobson PS, Klavinskis LS. *Bacillus subtilis* spores: a novel microparticle adjuvant which can instruct a balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen. *Eur J Immunol.* 2007;37(6):1538–1547. doi:10.1002/eji.200636875.
- [9] Huang JM, Hong HA, Van Tong H, Hoang TH, Brisson A, Cutting SM. Mucosal delivery of antigens using adsorption to bacterial spores. *Vaccine.* 2010;28(4):1021–1030. doi:10.1016/j.vaccine.2009.10.127.
- [10] Nascimento LO et al. *Bacillus atrophaeus* inactivated spores as a potential adjuvant for veterinary rabies vaccine. *Vaccine.* 2012;30(23):3351–3354. doi:10.1016/j.vaccine.2012.03.029.
- [11] Song M et al. Killed *Bacillus subtilis* spores as a mucosal adjuvant for an H5N1 vaccine. *Vaccine.* 2012;30(22):3266–3277. doi:10.1016/j.vaccine.2012.03.016.
- [12] de Souza RD et al. *Bacillus subtilis* spores as vaccine adjuvants: further insights into the mechanisms of action. *PLoS One.* 2014; 9(1):e87454. doi:10.1371/journal.pone.0087454.
- [13] Aps LR, Diniz MO, Porchia BF, Sales NS, Moreno AC, Ferreira LC. *Bacillus subtilis* spores as adjuvants for DNA vaccines. *Vaccine.* 2015;33(20):2328–2334. doi:10.1016/j.vaccine.2015.03.043.
- [14] Gil-Turnes C, Conceição FR, Gil De Los Santos JR. *Bacillus cereus* var. *toyoi* improves feed efficiency and health in animals. *Int J Probiotics Prebiotics* 2007;2:21–28.
- [15] Williams LD, Burdock GA, Jiménez G, Castillo M. Literature review on the safety of Toyocerin, a non-toxicogenic and non-pathogenic *Bacillus cereus* var. *toyoi* preparation. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2009;55(2):236–246. doi:10.1016/j.yrtph.2009.07.009.

- [16] Schierack P, Wieler LH, Taras D, et al. *Bacillus cereus* var. *toyoi* enhanced systemic immune response in piglets. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007;118(1–2):1–11. doi:10.1016/j.vetimm.2007.03.006.
- [17] Roos TB et al. Effect of *Bacillus cereus* var. *Toyoi* and *Saccharomyces boulardii* on the immune response of sheep to vaccines, *Food Agricultural Immunol.* 2010;21:2:113–118. doi: 10.1080/09540100903443691.
- [18] Roos TB, de Lara AP, Dummer LA, Fischer G, Leite FP. The immune modulation of *Bacillus cereus* var. *Toyoi* in mice immunized with experimental inactivated Bovine Herpesvirus Type 5 vaccine. *Vaccine.* 2012;30(12):2173–2177. doi:10.1016/j.vaccine.2012.01.007.
- [19] Roos TB, de Moraes CM, Sturbelle RT, Dummer LA, Fischer G, Leite FPL. Probiotics *Bacillus toyonensis* and *Saccharomyces boulardii* improve the vaccine immune response to Bovine herpesvirus type 5 in sheep. *Res Vet Sci.* 2018;117:260–265. doi:10.1016/j.rvsc.2017.12.022
- [20] Santos FDS, Menegon YA, Piraine REA, Rodrigues PRC, Cunha RC, Leite FPL. *Bacillus toyonensis* improves immune response in the mice vaccinated with recombinant antigen of bovine herpesvirus type 5. *Benef Microbes.* 2018;9(1):133–142. doi:10.3920/BM2017.0021.
- [21] Santos FDS et al. A probiotic treatment increases the immune response induced by the nasal delivery of spore-adsorbed TTFC. *Microb Cell Fact.* 2020;19(1):42. doi:10.1186/s12934–020–01308–1.
- [22] Rissi DR et al. Meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. *Pesq Vet Bras.* 2007;27(7):251–260. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2007000700001>.
- [23] Salvador SWC et al. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. *Pesq Vet Bras.* 1998;18:75–82 <https://doi.org/10.1590/S0100-736X1998000200007>.
- [24] Carrillo BJ et al. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. *Zentbl. Vet Med B.* 1983;30(5):327–332. doi:10.1111/j.1439–0450.1983.tb01852.x.
- [25] Perez SE et al. Análisis retrospectivo de casos com diagnóstico de necrosis cérebro cortical y su relación com herpesvirus bovino tipo 5. *Rev Argent Microbiol.* 2003;35:69–73.
- [26] Riet-Correa G et al. Meningoencefalite e poliencefalomalacia causada por herpesvirus bovino-5 no Estado do Pará. *Pesq Vet Bras.* 2006;26:44–46.
- [27] Dummer LA et al. Immune responses of mice against recombinant bovine herpesvirus 5 glycoprotein D. *Vaccine.* 2014;32(21):2413–2419. doi:10.1016/j.vaccine.2014.03.011.
- [28] Araujo IL et al. Immune responses in bovines to recombinant glycoprotein D of bovine herpesvirus type 5 as vaccine antigen. *Vaccine.* 2018;36(50):7708–7714. doi:10.1016/j.vaccine.2018.10.080.
- [29] Foerster HF, Foster JW. Endotrophic calcium, strontium, and barium spores of *Bacillus megaterium* and *Bacillus cereus*. *J Bacteriol.* 1966;91(3):1333–1345.
- [30] Tavares MB et al. *Bacillus subtilis* endospores at high purity and recovery yields: optimization of growth conditions and purification method. *Curr Microbiol.* 2013;66(3):279–285. doi:10.1007/s00284–012–0269–2.
- [31] Dummer LA et al. Cloning and expression of a truncated form of envelope glycoprotein D of Bovine herpesvirus type 5 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Virol Methods.* 2009;161(1):84–90. doi:10.1016/j.jviromet.2009.05.022.
- [32] Fischer G, Conceição FR, Leite FP, et al. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine.* 2007; 25(7):1250–1256. doi:10.1016/j.vaccine.2006.10.005.
- [33] Leary S et al. *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition* (American Veterinary Medical Association, Schaumburg, Illinois, USA, 2020).

- [34] Cardona PJ et al. Widespread bronchogenic dissemination makes DBA/2 mice more susceptible than C57BL/6 mice to experimental aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 2003;71(10):5845–5854. doi:10.1128/iai.71.10.5845–5854.2003.
- [35] Bustin SA et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797.
- [36] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001;25(4):402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- [37] Istatico R et al. Non-recombinant display of the B subunit of the heat labile toxin of *Escherichia coli* on wild type and mutant spores of *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact*. 2013;12:98. doi:10.1186/1475–2859–12–98.
- [38] Markine-Goriaynoff D, Coutelier JP. Increased efficacy of the immunoglobulin G2a subclass in antibody-mediated protection against lactate dehydrogenase-elevating virus-induced polioencephalomyelitis revealed with switch mutants. *J Virol*. 2002;76(1):432–435. doi:10.1128/jvi.76.1.432–435.2002.
- [39] Coutelier JP, van der Logt JT, Heessen FW, Warnier G, Van Snick J. IgG2a restriction of murine antibodies elicited by viral infections. *J Exp Med*. 1987;165(1):64–69. doi:10.1084/jem.165.1.64.
- [40] Kool M, Fierens K, Lambrecht BN. Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant. *J Med Microbiol*. 2012;61:927–934. doi:10.1099/jmm.0.038943–0.
- [41] Cain DW, Sanders SE, Cunningham MM, Kelsoe G. Disparate adjuvant properties among three formulations of “alum”. *Vaccine*. 2013;31(4):653–660. doi:10.1016/j.vaccine.2012.11.044.
- [42] Klasse PJ. Neutralization of Virus Infectivity by Antibodies: Old Problems in New Perspectives. *Adv Biol*. 2014;2014:157895. doi:10.1155/2014/157895.
- [43] Apostólico JDS, Lunardelli VA, Coirada FC, Boscardin SB, Rosa DS. Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. *J Immunol Res*. 2016;2016:1459394. doi:10.1155/2016/1459394.
- [44] Oleszycka E, McCluskey S, Sharp FA, et al. The vaccine adjuvant alum promotes IL-10 production that suppresses Th1 responses. *Eur J Immunol*. 2018;48(4):705–715. doi:10.1002/eji.201747150.
- [45] Wan YY, Flavell RA. How diverse--CD4 effector T cells and their functions. *J Mol Cell Biol*. 2009;1(1):20–36. doi:10.1093/jmcb/mjp001.
- [46] Martín-Fontecha A, et al. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol*. 2004;5(12):1260–1265. doi:10.1038/ni1138.
- [47] Mori A et al. The vaccine adjuvant alum inhibits IL-12 by promoting PI3 kinase signaling while chitosan does not inhibit IL-12 and enhances Th1 and Th17 responses. *Eur J Immunol*. 2012;42(10):2709–2719. doi:10.1002/eji.201242372.
- [48] Cerovic V, Jenkins CD, Barnes AG, Milling SW, MacPherson GG, Klavinskis LS. Hyporesponsiveness of intestinal dendritic cells to TLR stimulation is limited to TLR4. *J Immunol*. 2009;182(4):2405–2415. doi:10.4049/jimmunol.0802318.
- [49] Ugolini M et al. Recognition of microbial viability via TLR8 drives T_{FH} cell differentiation and vaccine responses. *Nat Immunol*. 2018;19(4):386–396. doi:10.1038/s41590–018–0068–4.
- [50] Savinov AY, Wong FS, Chervonsky AV. IFN-gamma affects homing of diabetogenic T cells. *J Immunol*. 2001;167(11):6637–6643. doi:10.4049/jimmunol.167.11.6637.
- [51] Hill N, Sarvetnick N. Cytokines: promoters and dampeners of autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2002;14(6):791–797. doi:10.1016/s0952–7915(02)00403-x.

- [52] Fensterl V, Sen GC. Interferons and viral infections. *Biofactors*. 2009;35(1):14–20. doi:10.1002/biof.6.
- [53] Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:485–517. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132710.
- [54] Mitsdoerffer M et al. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(32):14292–14297. doi:10.1073/pnas.1009234107.
- [55] Plomp M, Carroll AM, Setlow P, Malkin AJ. Architecture and assembly of the *Bacillus subtilis* spore coat. *PLoS One*. 2014;9(9):e108560. doi:10.1371/journal.pone.0108560.

5 DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

Esporos de *Bacillus toyonensis* e de outras espécies do gênero *Bacillus*, além de serem utilizados como probióticos, apresentam propriedades imunomoduladoras e vêm sendo estudados como adjuvantes em diversas vacinas experimentais veterinárias e humanas (Aps et al., 2015; Oliveira-Nascimento et al., 2012; Roos et al., 2012; De Souza et al., 2014; Santos et al., 2018). Estudos utilizando esporos de *Bacillus* como adjuvante foram avaliados e a modulação da resposta imune foi demonstrada pelo aumento de anticorpos específicos contra os antígenos vacinais, pela caracterização das classes de anticorpos, pela transcrição de mRNA ou expressão relativa de citocinas e pela estimulação e proliferação de células imunes.

Esporos de microrganismos como *B. toyonensis*, *B. subtilis* e *B. atrophaeus* são capazes de melhorar a eficácia de diferentes vacinas experimentais testadas em modelo animal (Oliveira-Nascimento et al., 2012; De Souza et al., 2014; Maubrigades et al., 2020). Os animais vacinados ou suplementados com esporos obtiveram um incremento na resposta imune sistêmica com produção de IgG e seus isotipos. Quando testados como adjuvantes de vacinas de mucosa, esporos também foram capazes de modular a resposta imune a nível de mucosa e sistêmico, com produção de IgA e IgG total, respectivamente. Sabe-se que os esporos atuam interagindo diretamente com APCs, particularmente DCs, sendo possivelmente reconhecidos por TLR2 e TLR4, dando início ao desenvolvimento de uma resposta imune inata e posteriormente adaptativa com a produção de anticorpos, como descrito na literatura (Bermudez-Brito et al., 2012; De Souza et al., 2014; Yan & Polk, 2011). Além disso, por possuírem características de alta resistência e estabilidade, os esporos bacterianos têm sido testados em diferentes vacinas de mucosa e surgem como adjuvantes de mucosa promissores, pois podem resistir a baixas condições de pH e à passagem pelo trato gastrointestinal (Sirec et al., 2012).

Animais que foram suplementados com esporos ou que receberam formulações vacinais que continham esporos de *Bacillus* também apresentaram níveis de transcrição e expressão de citocinas pró-inflamatórias, juntamente com significantes maiores taxas de proliferação de células imunes, como linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Esses achados sugerem que os esporos são capazes de modular a resposta imune celular induzida por vacinas, possivelmente por meio de um mecanismo de

ação envolvendo a ativação e maturação de células imunes. Essas células são principalmente APCs, como macrófagos e DCs, que podem ser estimuladas diretamente pelos esporos a produzirem citocinas e moléculas coestimuladoras como CD40, CD25, e CD86, que vão auxiliar no processo de recrutamento de células imunes e ativação de linfócitos T virgem e sua diferenciação em T CD4⁺ e T CD8⁺, direcionando o tipo de resposta imune (Aps et al., 2015; De Souza et al., 2014; Dong et al., 2017). Portanto, acredita-se que os esporos possam amplificar a interação do antígeno com as APCs, aumentando sua ativação e proliferação e promovendo um aumento da resposta imune vacinal.

Esporos podem ser utilizados em vacinas em diferentes abordagens existentes, como a recombinante, na qual os esporos são geneticamente modificados para expressar um antígeno alvo na sua superfície; a não recombinante, na qual antígenos são adsorvidos na superfície dos esporos; ou ainda suplementados por via oral como probióticos (Isticato & Ricca, 2014). Ambas as abordagens demonstraram um incremento na resposta imune humoral e celular dos animais que receberam esporos. Diversos trabalhos tem testado o uso de esporos como adjuvantes na forma não recombinante (Aps et al., 2015; De Souza et al., 2014; Maubrigades et al., 2020; Song et al., 2012), o que pode estar relacionado à eficácia desse método, visto que ele é significativamente mais eficiente em relação ao método recombinante, permitindo utilizar cerca de 70 vezes menos esporos para entregar uma quantidade equivalente de antígeno, além de evitar a construção de cepas recombinantes e a liberação de bactérias geneticamente modificadas no ambiente (Isticato et al., 2013).

No presente trabalho, esporos vivos e inativados de *B. toyonensis* foram testados como adjuvante em uma vacina contendo a rgD de BoHV-5 e o adjuvante alumen em camundongos. Os grupos de animais que receberam a rgD associada a esporos de *B. toyonensis* na formulação vacinal apresentaram níveis superiores de IgG total no soro, bem como dos isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b, sugerindo que os esporos amplificaram a resposta imune humoral específica contra a rgD, induzindo uma resposta predominante do tipo Th1, em concordância com experimentos anteriores realizados com esporos (Huang et al., 2010; Isticato et al., 2013; Santos et al., 2020a). Em camundongos, os isotipos IgG2a e IgG2b são moléculas de IgG com características pró-inflamatórias, considerados os mais potentes na ativação de mecanismos efetores em uma resposta imune antiviral (Coutelier et al., 1987; Markine-Goriaynoff & Coutelier, 2002).

Microrganismos probióticos do gênero *Bacillus* também são capazes de modular o perfil de citocinas produzidas pelas células imunes do hospedeiro, direcionando assim a polarização da resposta imune (Barberi et al., 2015; Azad et al., 2018). Os esplenócitos de camundongos que receberam a vacina contendo a rgD em associação com esporos, vivos ou inativados, de *B. toyonensis* adsorvidos ao alumen apresentaram níveis significativamente maiores de transcrição de mRNA de *IL12*, *IL17* e *IFN-γ* quando comparados aos animais que receberam somente a rgD adsorvida ao alumen. Citocinas como *IL12* e *IFN-γ* são características de uma resposta Th1 e são importantes em uma resposta imune antiviral, o que é desejado para uma vacina contra o BoHV-5. A maior produção de *IL17* se dá pelos linfócitos Th17, que são células altamente pró-inflamatórias e auxiliam na estimulação de linfócitos B (Korn et al., 2009). Além disso, promovem a formação de centros germinativos, juntamente com a troca de isotipos para IgG1, IgG2a e IgG2b (Mitsdoerffer et al., 2010), os quais foram detectados em níveis significantes elevados no soro dos animais que receberam a vacina de rgD associada aos esporos.

O adjuvante alumen foi utilizado nas preparações das vacinas contendo a rgD em camundongos e é extensivamente utilizado em vacinas veterinárias. O alumen funciona principalmente como um depósito no sítio de inoculação, que libera lentamente o antígeno para reconhecimento pelo sistema imune (Ghimire et al., 2012; Marrack et al., 2009). Atualmente, sabe-se que a adjuvantividade do alumen também consiste na polarização de respostas do tipo Th2 pela ativação da via de inflamassoma NLRP3, assim como é conhecido que ele também inibe a polarização de respostas Th1 pelo bloqueio da secreção de *IL12* pelas DCs (Li et al., 2007; Coffman et al., 2010; Mori et al., 2012). Os resultados observados em camundongos vacinados com a rgD associada aos esporos, sugerem que os esporos de *B. toyonensis* podem induzir uma resposta predominante tipo Th1, reduzindo o efeito polarizador de respostas Th2 mediado pelo alumen.

Os dados obtidos neste trabalho sugerem que os esporos de *B. toyonensis* apresentam efeito adjuvante na resposta imune de camundongos vacinados com a rgD de BoHV-5. Entretanto, estudos mais aprofundados se fazem necessários para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nessa modulação. A partir dos resultados obtidos no presente estudo, é importante a realização de pesquisas complementares, principalmente na ativação e maturação de populações de células do sistema imune como: DCs, macrófagos e linfócitos, para se melhor compreender

o papel modulador dos esporos. Experimentos, como a avaliação na ativação, formação e manutenção de centros germinativos e avaliação de outras moléculas envolvidas na resposta imune, como receptores TLR, também são de grande importância. Outro ponto considerável a ser explorado é testar o uso de esporos em associação com outros adjuvantes ou antígenos já conhecidos, bem como por meio de outras vias de administração, podendo-se ampliar sua utilização na adjuvantividade de diferentes antígenos vacinais.

6 CONCLUSÃO GERAL

Os esporos de bactérias do gênero *Bacillus* possuem propriedades imunomoduladoras, sendo capazes de melhorar a eficácia de vacinas. Esporos de *B. subtilis*, *B. atrophaeus* e *B. toyonensis* são capazes de aprimorar a resposta imune humoral e celular induzida por diferentes antígenos vacinais em modelo animal. Animais suplementados por via oral ou vacinados apresentaram títulos significativamente superior de anticorpos, aumento na transcrição e expressão de citocinas pró-inflamatórias e proliferação de células imunes, como linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺.

Os camundongos que receberam a vacina contendo somente esporos vivos ou esporos vivos e inativados de *B. toyonensis* adsorvidos ao alumen apresentaram um incremento na resposta imune humoral e celular, com aumento nos níveis de IgG, isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b, presença de anticorpos neutralizantes e maiores níveis de transcrição de mRNA de citocinas como *IL4*, *IL12*, *IL17*, e *IFN-γ*. Portanto, esporos de bactérias do gênero *Bacillus* apresentam propriedades imunomoduladoras, surgindo como promissores adjuvantes e como uma possível alternativa para melhorar a resposta de vacinas.

7 REFERÊNCIAS

- ABDULMAWJOOD, A., HERRMANN, J., RIEDE ID, S., ID, G.J., BECKER, A. & BREVES, G. (2019). Evaluation of enterotoxin gene expression and enterotoxin production capacity of the probiotic strain *Bacillus toyonensis* BCT-7112 T. *PLoS One*. 14(4).
- ACKERMANN, M.R., DERSCHIED, R. & ROTH, J.A. (2010). Innate immunology of bovine respiratory disease. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. 26(2). p. 215–228.
- ALOU, M.T., RATHORED, J., KHELAIFIA, S., MICHELLE, C., BRAH, S., DIALLO, B.A., RAOULT, D. & LAGIER, J.C. (2015). *Bacillus rubiinfantis* sp. nov. strain mt2T, a new bacterial species isolated from human gut. *New Microbes and New Infections*. 8. p. 51–60.
- ALVES DUMMER, L., LEITE, F.P.L. & VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. (2014). Bovine herpesvirus glycoprotein D: A review of its structural characteristics and applications in vaccinology. *Veterinary Research*. 45(1). p. 1–12.
- ANTÔNIO DE OLIVEIRA VIU, M., RENATA OLIVEIRA DIAS, L., TOLEDO LOPES, D., FEIJÓ MARCONDES VIU, A. & TREVIZOLI FERRAZ, H. (2014). Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia. Rinotraqueíte infecciosa bovina: revisão. *PUBVET*. 8(4).
- ANZILIERO, D., DOS SANTOS, C.M.B., BAUERMANN, F. V, CARDOZO, L., BERNARDES, L.M., BRUM, M.C.S., WEIBLEN, R. & FLORES, E.F. (2011). A recombinant bovine herpesvirus 5 defective in thymidine kinase and glycoprotein E is attenuated and immunogenic for calves 1. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 31(1). p. 23-30.
- ANZILIERO, D., MARTINS, M., WEISS, M., MONTEIRO, F.L., ATAIDE, C.F., WEIBLEN, R. & FLORES, E.F. (2014). Resposta sorológica aos herpesvirus bovino tipos 1 e 5 e vírus da diarreia viral bovina induzida por vacinas comerciais. *Ciencia Rural*. 45(1). p. 58–63.
- APOSTÓLICO, J.D.S., LUNARDELLI, V.A.S., COIRADA, F.C., BOSCARDIN, S.B. & ROSA, D.S. (2016). Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. *Journal of Immunology Research*. 2016.
- APS, L.R.M.M., DINIZ, M.O., PORCHIA, B.F.M.M., SALES, N.S., MORENO, A.C.R. & FERREIRA, L.C.S. (2015). *Bacillus subtilis* spores as adjuvants for DNA vaccines. *Vaccine*. 33(20). p. 2328–2334.
- ARAUJO, I.L., DUMMER, L.A., RODRIGUES, P.R.C., DOS SANTOS, A.G., FISCHER, G., CUNHA, R.C. & LEITE, F.P.L. (2018). Immune responses in bovines to recombinant glycoprotein D of bovine herpesvirus type 5 as vaccine antigen. *Vaccine*. 36(50). p. 7708–7714.
- ARTHUR M. KRIEG (2007). *Toll-free vaccines?*. *Nature Biotechnology*. 25(6):687.
- AWATE, S., BABIUK, L.A. & MUTWIRI, G. (2013). Mechanisms of action of adjuvants. *Frontiers in Immunology*. 4:114.
- AZAD, M.A.K., SARKER, M. & WAN, D. (2018). Immunomodulatory Effects of Probiotics on Cytokine Profiles. *BioMed Research International*.
- BABIUK, L.A., L'ITALIEN, J., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., ZAMB, T., LAWMAN, J.P., HUGHES, G. & GIFFORD, G.A. (1987). Protection of Cattle from Bovine Herpesvirus Type 1 (BHV-1) Infection by immunization with individual Viral

Glycoproteins. *Virology*. 159(1). p. 57-66.

- BABIUK, L.A., VAN, S., LITTEL-VAN DEN HURK, D. & TIKOO, S.K. (1996). Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Veterinary Microbiology*. 53(1-2). p. 31-42.
- BARBERI, C., CAMPANA, S., DE PASQUALE, C., RABBANI KHORASGANI, M., FERLAZZO, G. & BONACCORSI, I. (2015). T cell polarizing properties of probiotic bacteria. *Immunology Letters*. 168(2). p. 337-342.
- BARNES, A.G.C., CEROVIC, V., HOBSON, P.S. & KLAVINSKIS, L.S. (2007). *Bacillus subtilis* spores: A novel microparticle adjuvant which can instruct balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen. *European Journal of Immunology*. 37(6). p. 1538-1547.
- BARRY, M. & BLEACKLEY, C.R. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nature Reviews Immunology*. 2(6). p. 401-409.
- BERMUDEZ-BRITO, M., PLAZA-DÍAZ, J., MUÑOZ-QUEZADA, S., GÓMEZ-LLORENTE, C. & GIL, A. (2012). Probiotic Mechanisms of Action. *Metabolism*. 61. p. 160-174.
- BHARDWAJ, N., GNJATIC, S. & SAWHNEY, N.B. (2010). TLR AGONISTS: Are They Good Adjuvants?. *The Cancer Journal*. 16(4). p. 382-391.
- BLACK, M., TRENT, A., TIRRELL, M. & OLIVE, C. (2010). Advances in the design and delivery of peptide subunit vaccines with a focus on Toll-like receptor agonists. *Expert Rev Vaccines*. 9(2). p. 157-173.
- BRITO, L.A. & O'HAGAN, D.T. (2014). Designing and building the next generation of improved vaccine adjuvants. *Journal of Controlled Release*. 190. p. 563-579.
- BRUM, M.C.S., CARON, L., CHOWDHURY, S.I., WEIBLEN, R. & FLORES, E.F. (2010). Immunogenicity of an inactivated bovine herpesvirus type 5 strain defective in thymidine kinase and glycoprotein E. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 30(1). p. 57-62.
- BURAKOVA, Y., MADERA, R., MCVEY, S., SCHLUP, J.R. & SHI, J. (2018). Adjuvants for Animal Vaccines. *Viral Immunology*. 31(1). p. 11-22.
- CAMPOS, F.S., FRANCO, A.C., HÜBNER, S.O., OLIVEIRA, M.T., SILVA, A.D., ESTEVES, P.A., ROEHE, P.M. & RIJSEWIJK, F.A.M. (2009). High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. *Veterinary Microbiology*. 139(1-2). p. 67-73.
- CARRILLO, B.J., AMBROGÍ, A., SCHUDEL, A.A., VAZQUEZ, M., DAHME, E. & POSPISCHIL, A. (1983). Meningoencephalitis caused by IBR Virus in Calves in Argentina. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*. 30(1-10). p. 327-332.
- CASCIO, K.E., BELKNAP, E.B., SCHULTHEISS, P.C., AMES, A.D. & COLLINS, J.K. (1999). Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 11(2). p. 134-139.
- CIABATTINI, A., PARIGI, R., ISTICATO, R., OGGIONI, M.R. & POZZI, G. (2004). Oral priming of mice by recombinant spores of *Bacillus subtilis*. *Vaccine*. 22(31-32). p. 4139-4143.
- CLARK, T.W., PAREEK, M., HOSCHLER, K., DILLON, H., NICHOLSON, K.G., GROTH, N. & STEPHENSON, I. (2009). Trial of 2009 Influenza A (H1N1) Monovalent MF59-Adjuvanted Vaccine. *New England Journal of Medicine*. 361(25). p. 2424-2435.

- COFFMAN, R.L., SHER, A., SEDER, R.A. (2010). Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*. 2010. 33(4). p. 492-503.
- COLAPRICO, A., SENESI, S., FERLICCA, F., BRUNELLI, B., UGOZZOLI, M., PALLAORO, M. & O'HAGAN, D.T. (2020). Adsorption onto aluminum hydroxide adjuvant protects antigens from degradation. *Vaccine*. 38(19). p. 3600–3609.
- COUTELIER, J.-P., VAN DER LOGT, J.T.M., FRANS, S., HEESSEN, W.A., WARNIER, G. & VAN SNICK, J. (1987). IgG2a restriction of murine antibodies elicited by viral infections. *Journal of Experimental Medicine*. 165(1). p. 64-69.
- CROME, S.Q., OHASHI, P.S. (2018). Immunoregulatory functions of innate lymphoid cells. *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 6(1). p. 121.
- CURTSINGER, J.M. & MESCHER, M.F. (2010). Inflammatory Cytokines as a Third Signal for T Cell Activation. *Current Opinion in Immunology*. 22(3). p. 333-340.
- CUSI, M.G. (2006). Applications of influenza virosomes as a delivery system. *Human Vaccines*. 2(1). p. 1-7.
- CUTTING, S.M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*. 28(2). p. 214–220.
- D'AMICO, C., FONTANA, F., CHENG, R. & SANTOS, H.A. (2021). Development of vaccine formulations: past, present, and future. *Drug Delivery and Translational Research*. p. 1-20.
- DE GREGORIO, E., CAPRONI, E. & ULMER, J.B. (2013). Vaccine adjuvants: Mode of action. *Frontiers in Immunology*. 4. p. 1–6.
- DEL MÉDICO ZAJAC, M.P., PUNTEL, M., ZAMORANO, P.I., SADIR, A.M. & ROMERA, S.A. (2006). BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. *Research in Veterinary Science*. 81(3). p. 327–334.
- DEL MÉDICO ZAJAC, M.P., LADELFA, M.F., KOTSIAS, F., MUYLKENS, B., THIRY, J., THIRY, E. & ROMERA, S.A. (2010). Biology of bovine herpesvirus 5. *Veterinary Journal*. 184(2). p. 138–145.
- DE SOUZA, R.D., BATISTA, M.T., LUIZ, W.B., CAVALCANTE, R.C.M., AMORIM, J.H., BIZERRA, R.S.P., MARTINS, E.G. & DE SOUZA FERREIRA, L.C. (2014). *Bacillus subtilis* spores as vaccine adjuvants: Further insights into the mechanisms of action. *PLoS One*. 9(1).
- DEN HAAN, J.M.M., ARENS, R. & VAN ZELM, M.C. (2014). The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunology Letters*. 162(2). p. 103–112.
- DONG, H., HUANG, Y., YAO, S., LIANG, B., LONG, Y., XIE, Y., MAI, J., GONG, S. & ZHOU, Z. (2017). The recombinant fusion protein of cholera toxin B and neutrophil-activating protein expressed on *Bacillus subtilis* spore surface suppresses allergic inflammation in mice. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 101(14). p. 5819–5829.
- DUC, L.H., HONG, H.A., FAIRWEATHER, N., RICCA, E. & CUTTING, S.M. (2003). Bacterial spores as vaccine vehicles. *Infection and Immunity*. 71(5). p. 2810–2818.
- DUMMER, L.A., CONCEIÇÃO, F.R., NIZOLI, L.Q., DE MORAES, C.M., ROCHA, A.R., DE SOUZA, L.L., ROOS, T., VIDOR, T. & LEITE, F.P.L. (2009). Cloning and expression of a truncated form of envelope glycoprotein D of Bovine herpesvirus type 5 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Virological Methods*. 161(1). p.

84–90.

- DUMMER, L.A., ARAUJO, I.L., FINGER, P.F., DOS SANTOS, A.G., DA ROSA, M.C., CONCEIÇÃO, F.R., FISCHER, G., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. & LEITE, F.P.L. (2014). Immune responses of mice against recombinant bovine herpesvirus 5 glycoprotein D. *Vaccine*. 32(21). p. 2413–2419.
- ELSHAGHABEE, F.M.F., ROKANA, N., GULHANE, R.D., SHARMA, C. & PANWAR, H. (2017). *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology*.
- FAN, Y.H., LIN, Y.L., HWANG, Y.C., YANG, H.C., CHIU, H.C., CHIOU, S.H., JONG, M.H., CHOW, K.C. & LIN, C.C. (2016). T-cell factor-4 and MHC upregulation in pigs receiving a live attenuated classical swine fever virus (CSFV) vaccine strain with interferon-gamma adjuvant. *Veterinary Journal*. 216. p. 148–156.
- FINO, T.C.M., MELO, C.B., RAMOS, A.F. & LEITE, R.C. Infecções por herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e suas implicações na reprodução bovina /Infections caused by bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) and its implications in bovine reproduction. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 6(2). p. 122-127.
- FLACH, T.L., NG, G., HARI, A., DESROSIERS, M.D., ZHANG, P., WARD, S.M., SEAMONE, M.E., VILAYSANE, A., MUCSI, A.D., FONG, Y., PRENNER, E., LING, C.C., TSCHOPP, J., MURUVE, D.A., AMREIN, M.W., SHI, Y. Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvant activity. *Nature Medicine*. 17(4). p. 479-487.
- FRENCH, E.L. (1962). A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. *Australian Veterinary Journal*. p. 216-221.
- FRITZE, D. & DIGER PUKALL, R. (2001). Reclassification of bioindicator strains *Bacillus subtilis* DSM 675 and *Bacillus subtilis* DSM 2277 as *Bacillus atrophaeus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. p. 35-37.
- GABEV, E., TOBLER, K., ABRIL, C., HILBE, M., SENN, C., FRANCHINI, M., CAMPADELLI-FIUME, G., FRAEFEL, C. & ACKERMANN, M. (2010). Glycoprotein D of Bovine Herpesvirus 5 (BoHV-5) Confers an Extended Host Range to BoHV-1 but Does Not Contribute to Invasion of the Brain. *Journal of Virology*. 84(11). p. 5583–5593.
- GHIMIRE, T.R., BENSON, R.A., GARSIDE, P. & BREWER, J.M. (2012). Alum increases antigen uptake, reduces antigen degradation and sustains antigen presentation by DCs in vitro. *Immunology Letters*. 147(1–2). p. 55–62.
- GIESKER, K. & HENSEL, M. (2014). Bacterial Vaccines. *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier.
- GIL-TURNES, C., CONCEIÇÃO, F.R. & GIL DE LOS SANTOS, J.R. (2007). *Bacillus cereus* var. *toyoï* improves feed efficiency and health in animals. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*. 2(1). p. 21–28.
- GLENNY, A.T., POPE, C.G., WADDINGTON, H. & WALLACE, U. (1926). Immunology Notes. XXIII. The Antigenic Value of Toxoid Precipitated by Potassium Alum. *The Journal of Pathology & Bacteriology*. p. 31-40.
- GLENNY, A.T., BUTTLE, H.G.A. & STEVEYS, M.F. (1931). Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea-pigs: toxoid precipitated with alum. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. p. 267-287.
- GLENWRIGHT, H., POHL, S., NAVARRO, F., MIRO, E., JIMÉNEZ, G., BLANCH, A.R. &

- HARWOOD, C.R. (2017). The Identification of Intrinsic Chloramphenicol and Tetracycline Resistance Genes in Members of the *Bacillus cereus* Group (sensu lato). *Frontiers in Microbiology*.
- GONÇALVES, V.S., DENIS, F., SANTOS, S., GONÇALVES, A., JUNIOR, S., EUGÊNIO, R., PIRAINÉ, A., RICARDO, P., RODRIGUES, C., LITCHINA BRASIL, C., CONRAD, N.L., PEREIRA, F. & LEITE, L. (2021). Journal Pre-proof Recombinant bovine IL17A acts as an adjuvant for bovine *herpesvirus vaccine*. *Research in Veterinary Science*.
- GREENWOOD, B. (2014). The contribution of vaccination to global health: past, present and future. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*
- 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).
- GUOYAN, Z., YINGFENG, A., ZABED, H., QI, G., YANG, M., JIAO, Y., LI, W., WENJING, S. & XIANGHUI, Q. (2019). *Bacillus subtilis* Spore Surface Display Technology: A Review of Its Development and Applications. *Journal of microbiology and biotechnology*. 29(2). p. 179–190.
- HAGE A-B, J.J., SCHUKKEN, Y.H., BARKERNA, H.W., BENEDICTUS, G., RIJSEWIJK, F.A.M. & WENTINK, G.H. (1996). Population dynamics of bovine herpesvirus 1 infection in a dairy herd. *Veterinary Microbiology*. 53(1-2). p. 169-180.
- HEEGAARD, P.M.H., DEDIEU, L., JOHNSON, N., LE POTIER, M.-F., MOCKEY, M., MUTINELLI, F., VAHLENKAMP, T. & VASCELLARI, M. (2011). Adjuvants and delivery systems in veterinary vaccinology: current state and future developments. *Archives of Virology*. 156(2). p. 183-202.
- HUANG, J.M., LA RAGIONE, R.M., NUNEZ, A. & CUTTING, S.M. (2008). Immunostimulatory activity of *Bacillus* spores. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 53(2). p. 195–203.
- HUANG, J.M., HONG, H.A., VAN TONG, H., HOANG, T.H., BRISSON, A. & CUTTING, S.M. (2010). Mucosal delivery of antigens using adsorption to bacterial spores. *Vaccine*. 28(4). p. 1021–1030.
- HUNG, L.H., LI, H.P., LIEN, Y.Y., WU, M.L. & CHAUNG, H.C. (2010). Adjuvant effects of chicken interleukin-18 in avian Newcastle disease vaccine. *Vaccine*. 28(5). p. 1148–1155.
- HUTCHINSON, S., BENSON, R.A., GIBSON, V.B., POLLOCK, A.H., GARSIDE, P., BREWER, J.M. Antigen depot is not required for alum adjuvanticity. *The FASEB Journal*. 26(3). p. 1272-1279.
- ISTICATO, R., SIREC, T., TREPPICCIONE, L., MAURANO, F., DE FELICE, M., ROSSI, M. & RICCA, E. (2013). Non-recombinant display of the B subunit of the heat labile toxin of *Escherichia coli* on wild type and mutant spores of *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*. 12(1).
- ISTICATO, R. & RICCA, E. (2014). Spore surface display. *Microbiology Spectrum*. 2(5).
- IWASAKI, A. & MEDZHITOV, R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 327(5963). p. 291–295.
- IWASAKI, A. & MEDZHITOV, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*. 5(10). p. 987–995.
- JIMÉNEZ, G., BLANCH, A.R., TAMAMES, J. & ROSSELLÓ-MORA, R. (2013). Complete

- genome sequence of *Bacillus toyonensis* BCT-7112T, the active ingredient of the feed additive preparation Toyocerin. *Genome Announcements*. 1(6).
- JIMÉNEZ, G., URDIAIN, M., CIFUENTES, A., LÓPEZ-LÓPEZ, A., BLANCH, A.R., TAMAMES, J., KÄMPFER, P., KOLSTØ, A.B., RAMÓN, D., MARTÍNEZ, J.F., CODOÑER, F.M. & ROSSELLÓ-MÓRA, R. (2013). Description of *Bacillus toyonensis* sp. 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(6). p. 383–391.
- JONES, C., FRIZZO DA SILVA, L. & SINANI, D. (2011). Regulation of the latency-reactivation cycle by products encoded by the bovine herpesvirus 1 (BHV-1) latency-related gene. *Journal of Neurovirology*. 17(6). p. 535–45.
- KAWAI, T. & AKIRA, S. (2011). Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity*. 34(5). p. 637–650.
- KAWASAKI, T. & KAWAI, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in Immunology*. 5. p. 1–8.
- KIM, H., NIU, L., LARSON, P., KUCABA, T.A., MURPHY, K.A., JAMES, B.R., FERGUSON, D.M., GRIFFITH, T.S. & PANYAM, J. (2018). Polymeric nanoparticles encapsulating novel TLR7/8 agonists as immunostimulatory adjuvants for enhanced cancer immunotherapy. *Biomaterials*. 164. p. 38–53.
- KLOTMAN, M.E. & CHANG, T.L. (2006). Defensins in innate antiviral immunity. *Nature Reviews in Immunology*. 6(6). p. 447–56.
- KORN, T., BETTELLI, E., OUKKA, M. & KUCHROO, V.K. (2009). IL-17 and Th17 cells. *Annual Review of Immunology*. 27. p. 485–517.
- KOTLA, S., SANGHRATNA VISHANATH, B., H.J., D., K., G., V.V.S., S. & REDDY, G.R. (2016). DNA vaccine (P1-2A-3C-pCDNA) co-administered with Bovine IL-18 gives protective immune response against Foot and Mouth Disease in cattle. *Veterinary Microbiology*. 193. p. 106–115.
- LAMBRECHT, B.N., KOOL, M., WILLART, M.A. & HAMMAD, H. (2009). Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Current Opinion in Immunology*. 21(1). p. 23–29.
- LEE, J.E., KYE, Y.-C., PARK, S.-M., SHIM, B.-S., YOO, S., HWANG, E., KIM, H., KIM, S.-J., HAN, S.H., PARK, T.S., PARK, B.-C. & YUN, C.-H. (2020). *Bacillus subtilis* spores as adjuvants against avian influenza H9N2 induce antigen-specific antibody and T cell responses in White Leghorn chickens. *Veterinary Research*. 51(1).
- LEE, S. & NGUYEN, M.T. (2015). Recent Advances of Vaccine Adjuvants for Infectious Diseases. *Immune Network*. 15(2). p. 51–57.
- LEROUX-ROELS, G. (2010). Unmet needs in modern vaccinology. Adjuvants to improve the immune response. *Vaccine*. 28. p. 25–36.
- LEVINGS, R.L. & ROTH, J.A. (2013). Immunity to bovine herpesvirus 1: I. Viral lifecycle and innate immunity. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*. 14(1). p. 88–102.
- LI, H., NOOKALA, S., & RE, F. (2007). Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1 β and IL-18 release. *Journal of Immunology*. 178(8). p. 5271–5276.
- LI, Y., WEI, C., XU, H., JIA, J., WEI, Z., GUO, R., JIA, Y., WU, Y., LI, Y., QI, X., LI, Z. & GAO,

- X. (2018). The immunoregulation of Th17 in host against intracellular bacterial infection. *Mediators of Inflammation*. 2018.
- MARKINE-GORIAYNOFF, D. & COUTELIER, J.-P. (2002). Increased Efficacy of the Immunoglobulin G2a Subclass in Antibody-Mediated Protection against Lactate Dehydrogenase-Elevating Virus-Induced Polioencephalomyelitis Revealed with Switch Mutants. *Journal of Virology*. 76(1). p. 432–435.
- MARRACK, P., MCKEE, A.S. & MUNKS, M.W. (2009). Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nature Reviews in Immunology*. 9(4). p. 287-293.
- MAUBRIGADES, L.R., SANTOS, F.D.S., GONÇALVES, V.S., RODRIGUES, P.R.C. & LEITE, F.P.L. (2020). Association of *Bacillus toyonensis* spores with alum improves bovine herpesvirus 5 subunit vaccine immune response in mice. *Vaccine*. 38(51). p. 8216-8223.
- MBOW, M.L., DE GREGORIO, E., VALIANTE, N.M. & RAPPUOLI, R. (2010). New adjuvants for human vaccines. *Current Opinion in Immunology*. 22(3). p. 411–416.
- MCKENNEY, P.T., DRIKS, A., ESKANDARIAN, H.A., GRABOWSKI, P., GUBERMAN, J., WANG, K.H., GITAI, Z. & EICHENBERGER, P. (2010). A Distance-Weighted Interaction Map Reveals a Previously Uncharacterized Layer of the *Bacillus subtilis* Spore Coat. *Current Biology*. 20(10). p. 934–938.
- MCKENNEY, P.T., DRIKS, A. & EICHENBERGER, P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews in Microbiology*. 11(1). p. 33-44.
- MEADOR-PARTON, J. & POPHAM, D.L. (2000). Structural Analysis of *Bacillus subtilis* Spore Peptidoglycan during Sporulation. *Journal of Bacteriology*. 182(16). p. 4491-4499.
- MITSDOERFFER, M., LEE, Y., JÄGER, A., KIM, H.J., KORN, T., KOLLS, J.K., CANTOR, H., BETTELLIE, E. & KUCHROO, V.K. (2010). Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(32). p. 14292–14297.
- MJÖSBORG, J. SPITS, H. (2016). Human innate lymphoid cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 138(5). p. 1265-1276.
- MYIAJI, E.N., CARVALHO, E., OLIVEIRA, M.L.S., RAW, I. & Ho, P.L. (2011). Trends in adjuvant development for vaccines: DAMPs and PAMPs as potential new adjuvant. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 44(6). p. 500-513.
- MONTICELLI, L.A., OSBORNE, L.C., NOTI, M., TRAN, S.V., ZAISS, D.M., ARTIS, D. (2015). IL-33 promotes an innate immune pathway of intestinal tissue protection dependent on amphiregulin-EGFR interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112(34). p. 10762-10767.
- MONTOMOLI, E., PICCIRELLA, S., KHADANG, B., MENNITTO, E., CAMERINI, R. & DE ROSA, A. (2011). Current adjuvants and new perspectives in vaccine formulation. *Expert Review of Vaccines*. 10(7). p. 1053–1061.
- MORI, A., OLESZYCKA, E., SHARP, F.A., COLEMAN, M., OZASA, Y., SINGH, M., O'HAGAN, D.T., TAJBER, L., CORRIGAN, O.I., MCNEELA, E.A., & LAVELLE, E.C. (2012). The vaccine adjuvant alum inhibits IL-12 by promoting PI3 kinase signaling while chitosan does not inhibit IL-12 and enhances Th1 and Th17 responses. *European*

- Journal of Immunology*. 42(10). p. 2709-2719.
- MURPHY, K.M. & REINER, S.L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nature Reviews Immunology*. 2(12). p. 933–944.
- MUYLKENS, B., THIRY, J., KIRTEN, P., SCHYNTS, F. & THIRY, E. (2007). Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Research*. 38(2). p. 181–209.
- NANDI, S., KUMAR, M., MANOHAR, M. & CHAUHAN, R.S. (2009). Bovine herpes virus infections in cattle. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*. 10(1). p. 85–98.
- NICHOLSON, W.L., MUNAKATA, N., HORNECK, G., MELOSH, H.J. & SETLOW, P. (2000). Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64(3). p. 548-572.
- O'HAGAN, D.T. & DE GREGORIO, E. (2009). The path to a successful vaccine adjuvant - "The long and winding road." *Drug Discovery Today*. 14(11–12). p. 541–551.
- OLESZYCKA, E. & LAVELLE, E.C. (2014). Immunomodulatory properties of the vaccine adjuvant alum. *Current Opinion in Immunology*. 28(1). p. 1–5.
- OLIVEIRA-NASCIMENTO, L., CARICATI, A.T.P., ABDULACK-LOPES, F., NEVES, L.C.M., CARICATI, C.P., PENNA, T.C. V & STEPHANO, M.A. (2012). *Bacillus atrophaeus* inactivated spores as a potential adjuvant for veterinary rabies vaccine. *Vaccine*. 30(23). p. 3351–3354.
- OUYANG, W., KOLLS, J.K. & ZHENG, Y. (2008). The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. *Immunity*. 28(4). p. 454–467.
- PACCEZ, J.D., NGUYEN, H.D., LUIZ, W.B., FERREIRA, R.C.C., SBROGIO-ALMEIDA, M.E., SCHUMAN, W. & FERREIRA, L.C.S. (2007). Evaluation of different promoter sequences and antigen sorting signals on the immunogenicity of *Bacillus subtilis* vaccine vehicles. *Vaccine*. 25(24). p. 4671–4680.
- PANDA, S.K., COLONNA, M. (2019). Innate lymphoid cells: A potential link between microbiota and immune responses against cancer. *Seminars in Immunology*. 41:101271.
- PASHINE, A., VALIANTE, N.M. & ULMER, J.B. (2005). Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nature Medicine*. 11(4). p. 63.
- PASUPULETI, M., SCHMIDTCHEN, A. & MALMSTEN, M. (2012). Antimicrobial peptides: Key components of the innate immune system. *Critical Reviews in Biotechnology*. 32(2). p. 143–171.
- PATTERSON, R., NERREN, J., KOGUT, M., COURT, P., VILLARREAL-RAMOS, B., SEYFERT, H.M., DALBY, P. & WERLING, D. (2012). Yeast-surface expressed BVDV E2 protein induces a Th1/Th2 response in naïve T cells. *Developmental and Comparative Immunology*. 37(1). p. 107–114.
- PAUL, W.E., ZHU, J. & YAMANE, H. (2010). Determination of Effector CD4 T Cell Populations. *Annual review of immunology*. 28(4). p. 445–489.
- PENNY, H.A., HODGE, S.H., HEPWORTH, M.R. (2018). Orchestration of intestinal homeostasis and tolerance by group 3 innate lymphoid cells. *Seminars in Immunopathology*. 40(4). p. 357-370.

- RAJPUT, Z.I., HU, S., XIAO, C.-W. & ARIJO, A.G. (2007). Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *Journal of Zhejiang University Science B*. 8(3). p. 153–161.
- RAMBE, D.S., GIUDICE, G. DEL, ROSSI, S. & SANICAS, M. (2015). Safety and Mechanism of Action of Licensed Vaccine Adjuvants. *International Current Pharmaceutical Journal*. 4(8). p. 420–431.
- REED, S.G., ORR, M.T. & FOX, C.B. (2013). Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nature Medicine*. 19. p. 1597–1608.
- RICCA, E., BACCIGALUPI, L., CANGIANO, G., DE FELICE, M. & ISTICATO, R. (2014). Mucosal vaccine delivery by non-recombinant spores of *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*. 13(1).
- RICCA, E. & CUTTING, S.M. (2003). Emerging Applications of Bacterial Spores in Nanobiotechnology. *Journal of Nanobiotechnology*. 1(1).
- RIET-CORREA, G., DUARTE, M.D., BARBOSA, J.D., OLIVEIRA, C.M.C., CERQUEIRA, V.D., BRITO, M.F. & RIET-CORREA, F. (2006). Meningoencefalite e polioencefalomalacia causadas por Herpesvírus bovino-5 no Estado do Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 26(1). p. 44-46.
- RISSI, D.R., RECH, R.R., FLORES, E.F., KOMMERS, G.D. & BARROS, C.S.L. (2007). Meningoencefalite por herpesvírus-bovino 5. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 27(7). p. 251-260.
- ROMANO, M., FANELLI, G., ALBANY, C.J., GIGANTI, G. & LOMBARDI, G. (2019). Past, Present, and Future of Regulatory T Cell Therapy in Transplantation and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology*. 1. p. 43.
- ROOS, T.B., DE MORAES, C.M., STURBELLE, R.T., DUMMER, L.A., FISCHER, G. & LEITE, F.P.L. (2018). Probiotics *Bacillus toyonensis* and *Saccharomyces boulardii* improve the vaccine immune response to Bovine herpesvirus type 5 in sheep. *Research in Veterinary Science*. 117. p. 260–265.
- ROOS, T.B., DE LARA, A.P. DE S.S., DUMMER, L.A., FISCHER, G. & LEITE, F.P.L. (2012). The immune modulation of *Bacillus cereus* var. Toyoi in mice immunized with experimental inactivated Bovine Herpesvirus Type 5 vaccine. *Vaccine*. 30(12). p. 2173–2177.
- RUECKERT, C. & GUZMÁN, C.A. (2012). Vaccines: From Empirical Development to Rational Design. *PLoS Pathogens*. 8(11).
- SALVADOR, S.C., LEMOS, R.A.A., RIET-CORREA, F., ROEHE, P.M. & OSÓRIO, A.L.A.R. (1998). Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 18(2). p. 76–83.
- SANTOS, F.D.S. (2016). Avaliação de *Bacillus toyonensis* como bioadjuvante em vacina recombinante. *UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS Faculdade de Veterinária Programa de Pós-Graduação em Veterinária*.
- SANTOS, F.D.S., MAZZOLI, A., MAIA, A.R., SAGGESE, A., ISTICATO, R., LEITE, F., IOSSA, S., RICCA, E. & BACCIGALUPI, L. (2020a). A probiotic treatment increases the immune response induced by the nasal delivery of spore-adsorbed TTFC. *Microbial Cell Factories*. 19(1).
- SANTOS, F.D.S., MAUBRIGADES, L.R., GONÇALVES, V.S., FRANZ, H.C., RODRIGUES,

- P.R.C., CUNHA, R.C. & LEITE, F.P.L. (2021). *Bacillus Toyonensis* BCT-7112T Spores as Parenteral Adjuvant of BoHV-5 Vaccine in a Murine Model. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*.
- SANTOS, F.D.S., FERREIRA, M.R.A., MAUBRIGADES, L.R., GONÇALVES, V.S., DE LARA, A.P.S., MOREIRA, C., SALVARANI, F.M., CONCEIÇÃO, F.R. & LEIVAS LEITE, F.P. (2020b). *Bacillus toyonensis* BCT-7112T transient supplementation improves vaccine efficacy in ewes vaccinated against *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *Journal of Applied Microbiology*. 130(3). p. 699-706
- SANTOS, F.D.S., MENEGON, Y.A., PIRAINÉ, R.E.A., RODRIGUES, P.R.C., CUNHA, R.C. & LEITE, L.P.L. (2018). *Bacillus toyonensis* improves immune response in the mice vaccinated with recombinant antigen of bovine herpesvirus type 5. *Beneficial Microbes*. 9(1). p. 133–142.
- SCHMIDT, S.T., FOGED, C., KORSHOLM, K.S., RADES, T. & CHRISTENSEN, D. (2016). Liposome-Based Adjuvants for Subunit Vaccines: Formulation Strategies for Subunit Antigens and Immunostimulators. *Pharmaceutics*. 8(1).
- ŠEDÝ, J.R., SPEAR, P.G. & WARE, C.F. Cross-regulation between herpesviruses and the TNF superfamily members. *Nature Reviews Immunology*. 8(11). p. 861-873.
- SETLOW, B., ATLURI, S., KITCHEL, R., KOZIOL-DUBE, K. & SETLOW, P. (2006). Role of Dipicolinic Acid in Resistance and Stability of Spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-Protective *I*-Type Small Acid-Soluble Proteins. *Journal of Bacteriology*. 188(11). p. 3740–3747.
- SETLOW, P. (1995). Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of *Bacillus* species. *Annual Review of Microbiology*. 49. p. 29-54.
- SHAH, R.R., HASSETT, K.J. & BRITO, L.A. (2017). Overview of vaccine adjuvants: Introduction, history, and current status. *Methods in Molecular Biology*. p. 1–13.
- SHAHIN, F., RAZA, S., YANG, K., HU, C., CHEN, Y., CHEN, H. & GUO, A. (2017). Bovine herpesvirus 1 tegument protein UL21 plays critical roles in viral secondary envelopment and cell-to-cell spreading. *Oncotarget*. 8(55). p. 94462-94480.
- SHAW, D.M., MERIEN, F., BRAAKHUIS, A. & DULSON, D. (2018). T-cells and their cytokine production: The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of strenuous exercise. *Cytokine*. 104. p. 136–142.
- SIEDLER, B.S. (2012). Avaliação de uma vacina de aplicação intravaginal contra o Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) associada a subunidade B recombinante da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (rLTB). Dissertação. UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS Programa de Pós-Graduação em Veterinária.
- SILVA, A.D., SPILKI, F.R., FRANCO, A.C., ESTEVES, P.A., HÜBNER, S.O., DRIEMEIER, D., OLIVEIRA, A.P., RIJSEWIJK, F. & ROEHE, P.M. (2006). Vaccination with a gE-negative bovine herpesvirus type 1 vaccine confers insufficient protection to a bovine herpesvirus type 5 challenge. *Vaccine*. 24(16). p. 3313–3320.
- SILVA, M.S., BRUM, M.C.S., LORETO, E.L.S., WEIBLEN, R. & FLORES, E.F. (2007). Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. *Virus Research*. 129(2). p. 191–199.
- SIREC, T., STRAZZULLI, A., ISTICATO, R., DE FELICE, M., MORACCI, M. & RICCA, E. (2012).

- Adsorption of β -galactosidase of *Alicyclobacillus acidocaldarius* on wild type and mutants spores of *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*. 11. p. 100.
- SONG, M., HONG, H.A., HUANG, J.-M., COLENUIT, C., KHANG, D.D., NGUYEN, T.V.A., PARK, S.-M., SHIM, B.-S., SONG, H.H., CHEON, I.S., JANG, J.E., CHOI, J., CHOI, Y.K., STADLER, K. & CUTTING, S.M. (2012). Killed *Bacillus subtilis* spores as a mucosal adjuvant for an H5N1 vaccine. *Vaccine*. 30(22). p. 3266–3277.
- SPILKI, F.R., SILVA, A.D., HÜBNER, S., ESTEVES, P.A., FRANCO, A.C., DRIEMEIER, D. & ROEHE, P.M. (2004). Partial protection induced by a BHV-1 recombinant vaccine against challenge with BHV-5. *Annals of the New York Academy of Sciences*. New York Academy of Sciences, p. 247–250.
- SPLITTER, G.A., ESKRA, L. & ABRUZZINIT, A.F. (1988). Cloned bovine cytolytic T cells recognize bovine herpes virus-1 in a genetically restricted, antigen-specific manner. *Immunology*. 63(1). p. 145-150.
- TAN, I.S. & RAMAMURTHI, K.S. (2014). Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology Reports*. 6(3). p. 212-225.
- TAVASSOLI, S., HINC, K., IWANICKI, A., OBUCHOWSKI, M. & AHMADIAN, G. (2013). Investigation of spore coat display of *Bacillus subtilis* β -galactosidase for developing of whole cell biocatalyst. *Archives of Microbiology*. 195(3). p. 197-202.
- TIKOO, S.K., FITZPATRICK, D.R., BABIUK, L.A. & ZAMB, T.J. (1990). Molecular Cloning, Sequencing, and Expression of Functional Bovine Herpesvirus 1 Glycoprotein gIV in Transfected Bovine Cells. *Journal of Virology*. 64(10). p. 5132-5142.
- TRAAG, B.A., DRIKS, A., STRAGIER, P., BITTER, W., BROUSSARD, G., HATFULL, G., CHU, F., ADAMS, K.N., RAMAKRISHNAN, L. & LOSICK, R. (2001). Do mycobacteria produce endospores?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107(2). p. 878-881.
- TURVEY, S.E. & BROIDE, D.H. (2010). Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 125(2 SUPPL. 2).
- VASUDEVAN, P., WEAVER, A., REICHERT, E.D., LINNSTAEDT, S.D. & POPHAM, D.L. (2007). Spore cortex formation in *Bacillus subtilis* is regulated by accumulation of peptidoglycan precursors under the control of sigma K. *Molecular Microbiology*. 65(6). p. 1582-1594.
- VIVIER, E., ARTIS, D., COLONNA, M., DIEFENBACH, A., DI SANTO, J.P., EBERL, G., KOYASU, S., LOCKSLEY, R.M., MCKENZIE, A.N.J., MEBIUS, R.E., POWRIE, F., SPITS, H. (2018). Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell*. 174(5). p. 1054-1066.
- VOGEL, F.S.F., CARON, L., FLORES, E.F., WEIBLEN, R., WINKELMANN, E.R., MAYER, S.V. & BASTOS, R.B. (2003). Distribution of Bovine Herpesvirus Type 5 DNA in the Central Nervous Systems of Latently, Experimentally Infected Calves. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(10). p. 4512–4520.
- WAN, Y.Y. & FLAVELL, R.A. (2009). How diverse-CD4 effector T cells and their functions. *Journal of Molecular Cell Biology*. 1(1). p. 20–36.
- WILLIAMS, L.D., BURDOCK, G.A., JIMÉNEZ, G. & CASTILLO, M. (2009). Literature review on the safety of Toyocerin®, a non-toxigenic and non-pathogenic *Bacillus cereus* var. toyoi preparation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 55(2). p. 236–246.
- WYLER, R., ENGELS, M. & SCHWYZER, M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis

- (BHV-1). (1989). In: WITTMANN, G. *Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs*. Boston: Kluwer Academic Publishers. p.1-72.
- YAN, F. & POLK, D.B. (2011). Probiotics and immune health. *Current Opinion in Gastroenterology*. 27(6). p. 496-501.
- YUE, D., CHEN, ZHUJUN, YANG, F., YE, F., LIN, S., HE, B., CHENG, Y., WANG, J., CHEN, ZIMIN, LIN, X., YANG, J., CHEN, H., ZHANG, Z., YOU, Y., SUN, H., WEN, A., WANG, L., ZHENG, Y., CAO, Y., ET AL. (2020). Crystal structure of bovine herpesvirus 1 glycoprotein D bound to nectin-1 reveals the basis for its low-affinity binding to the receptor. *Science Advances*. 6(20).

8 ANEXOS

Anexo A – Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal

19/11/2019

SEI/UFPEL - 0768225 - Parecer



PARECER Nº
PROCESSO Nº

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
143/2019/CEEA/REITORIA
23110.047275/2019-83

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “Utilização de esporos de *Bacillus* spp. como sistema de entrega de antígenos vacinais”, registrada com o nº 23110.047275/2019-83, sob a responsabilidade de Fábio Pereira Leivas Leite - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer FAVORÁVEL a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 13 de novembro de 2019.

Solicitamos que o TCLE seja preenchido com o nome da Chefe do Biotério Central e assinado pela mesma.

Finalidade	(x) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	01/12/2019 a 10/03/2021
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> /Balb/c
Nº de animais	80
Idade	28 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central - UFPel

Código para cadastro nº CEEA 47275-2019

MV. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

19/11/2019

SEI/UFPA - 0788226 - Parecer



Documento assinado eletronicamente por ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX, Médico Veterinário, em 19/11/2019, às 09:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.389, de 8 de outubro de 2014](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_destino_externo=0, informando o código verificador 0788226 e o código CRC 7892ACF4.

Referência: Processo nº 23110.047275/2019-83

SEI nº 0788226