UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico - CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso

Avaliação de esporos de *Bacillus toyonensis* como adjuvante de vacina recombinante contra Herpesvírus Bovino tipo 5 em camundongos

Lucas Reichert Maubrigades

Pelotas, 2018

Lucas Reichert Maubrigades

Avaliação de esporos de *Bacillus toyonensis* como adjuvante de vacina recombinante contra Herpesvírus Bovino tipo 5 em camundongos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Acadêmico: Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

Orientador de Estágio: MSc. Vitória Sequeira Gonçalves

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M447a Maubrigades, Lucas Reichert

Avaliação de esporos de Bacillus toyonensis como adjuvante de vacina recombinante contra Herpesvírus Bovino tipo 5 em camundongos / Lucas Reichert Maubrigades ; Fábio Pereira Leivas Leite, orientadora. — Pelotas, 2018.

59 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Vacina. 2. Adjuvante. 3. Esporos. 4. Imunomodulação. 5. BoHV-5. I. Leite, Fábio Pereira Leivas, orient. II. Título.

CDD : 615.372

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Lucas Reichert Maubrigades

Avaliação de esporos de *Bacillus toyonensis* como adjuvante de vacina recombinante contra Herpesvírus bovino tipo 5 em camundongos

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para a obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 14/11/2018

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (Orientador)
Ph.D. em Veterinary Sciences pela University of Wisconsin

Prof. Dr. Alan John Alexander McBride
Ph.D. em Bioquímica e Biologia Molecular Aplicada pela University of Manchester Institute of Science and Technology (UMIST)

Prof. Drª. Thaís Larré Oliveira
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

MSc. Francisco Denis Souza Santos
Mestre em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

MSc. Vitória Sequeira Gonçalves
Mestra em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico este trabalho a minha família, pelo amor incondicional.

Agradecimentos

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

À 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 como Francisca, Maria, Augusto, Alexandre e Gabriel e aqueles que construí dentro da faculdade, principalmente Isadora, Pedro, Matheus, Bruno e Bernardo, com os quais criei uma grande amizade.

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

Ao professor Dr. Fábio Leivas Leite pela orientação neste trabalho e pela ajuda e companheirismo durante toda a faculdade.

Ao companheiro incansável e amigo Francisco Denis, que me guiou desde que ingressei no laboratório e se esforçou ao máximo para me ajudar da melhor maneira possível durante todo o período de realização do trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia, que fazem/fizeram parte do nosso grupo de pesquisa: Rodrigo, Carol, Yasmine, Renan, Vitória, Paulo, Pedro, Aline, Rafaela, Gustavo, Helen, e a equipe do Laboratório XI pela ajuda e apoio durante os experimentos

A 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.

Ao curso de Bacharelado em Biotecnologia, que ao longo do tempo me proporcionou extremo conhecimento e amadurecimento como pessoa.

Ao CNPq pela Bolsa de Iniciação Científica.

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

Resumo

MAUBRIGADES, Lucas Reichert. **Avaliação de esporos de *Bacillus toyonensis* como adjuvante de vacina recombinante contra Herpesvírus Bovino tipo 5 em camundongos.** 2018. 59f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Curso de Bacharelado em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Adjuvantes são compostos que potencializam a resposta imune. Esporos de algumas bactérias do gênero *Bacillus* são capazes de potencializar a resposta imune quando utilizados em vacinas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito adjuvante de esporos de *Bacillus toyonensis* associados a glicoproteína D recombinante (rgD) de Herpesvírus Bovino tipo 5 (BoHV-5) em camundongos. Os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos experimentais. O grupo rgD + esp. vivo recebeu esporos (esp.) vivos de *B. toyonensis* associados a rgD, o grupo rgD + esp. inat recebeu esporos inativados (inat) associados a rgD, o grupo rgD + esp. vivo + alumen recebeu esporos vivos associados a rgD adsorvida a 10% de hidróxido de alumínio (alumen), o grupo rgD + esp. inat + alumen recebeu esporos inativados associados a rgD adsorvida ao alumen, o grupo rgD + alumen recebeu a rgD adsorvida ao alumen e o grupo rgD + PBS recebeu a rgD com solução salina fosfatada. A resposta imune humoral foi avaliada pela análise dos títulos de IgG total e anticorpos neutralizantes contra o BoHV-5. Foi realizado cultivo dos esplenócitos dos camundongos para avaliar a transcrição relativa de mRNA de citocinas. Os animais de todos os grupos responderam a vacinação com a produção de anticorpos IgG totais. Foram observados níveis significativos ($p<0,05$) de anticorpos IgG totais de até 7.5 vezes maiores no grupo que recebeu esporos vivos associados a rgD e adsorvidos ao alumen e 12 vezes maiores no grupo que recebeu esporos inativados associados a rgD e adsorvidos ao alumen, quando comparados ao grupo rgD + alumen (controle). Os grupos que receberam esporos na formulação vacinal apresentaram níveis significativamente superiores ($p<0,05$) dos isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b quando comparados ao grupo rgD + alumen, demonstrando a modulação da resposta imune. Os esplenócitos dos camundongos dos grupos que receberam esporos na formulação vacinal apresentaram níveis significativos ($p<0,05$) de IFN-γ de até 3 vezes maiores e IL-17 de até 13 vezes maiores quando comparados ao grupo rgD + alumen. Os grupos que receberam a rgD associada a esporos vivos adsorvidos ao alumen e a esporos inativados adsorvidos ao alumen apresentaram títulos significativos ($p<0,05$) de anticorpos neutralizantes quando comparados aos demais grupos. Os resultados sugerem que os esporos de *B. toyonensis* associados a glicoproteína D recombinante de herpesvírus Bovino tipo 5 em camundongos apresentaram efeito imunomodulador, melhorando a resposta imune e aumentando a imunogenicidade das vacinas.

Palavras-Chave: vacina; adjuvante; esporos; imunomodulação; BoHV-5.

Abstract

MAUBRIGADES, Lucas Reichert. **Assessment of *Bacillus toyonensis* spores as adjuvant for recombinant vaccine against Bovine Herpesvirus type 5 in mice.** 2018. 59f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Curso de Bacharelado em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Adjuvants are compounds that potentiate the immune response. Spores of bacteria of the genus *Bacillus* are able to potentiate the immune response when used in vaccines. The aim of this study was to evaluate the adjuvant effect of *Bacillus toyonensis* spores associated with Bovine Herpesvirus type 5 (BoHV-5) recombinant D-glycoprotein (rgD) in mice. The animals were randomly assigned into six experimental groups. The rgD + esp. vivo group received live spores (esp.) of *B. toyonensis* associated with rgD, rgD + esp. inat group received inactivated spores (inat) associated with rgD, the rgD + esp. vivo + alumen group received live spores associated with rgD adsorbed at 10% aluminum hydroxide (alum), rgD + esp. inat + alumen group received inactivated spores associated with rgD adsorbed to alum, rgD + alumen group received rgD adsorbed to alum and rgD + PBS group received rgD with phosphate saline solution. The humoral immune response was assessed by the analysis of total IgG titers and neutralizing antibodies. The mice splenocytes were cultured to evaluate the relative mRNA transcription of cytokines. Animals from all groups responded to vaccination with the production of total IgG antibodies. Statistically significant levels ($p<0.05$) of total IgG antibodies up to 7.5 times were observed in the group that received live spores associated to rgD and adsorbed to the alum and 12 times in the group that received inactivated spores associated to rgD and adsorbed to the alum, when compared to the rgD + alumen group (control). The groups that received spores in the vaccine formulation had significantly higher levels ($p<0.05$) of the IgG1, IgG2a and IgG2b isotypes when compared to the rgD + alumen group, demonstrating the modulation of the immune response. The spleen cells of groups that received spores in the vaccine formulation had significant levels ($p<0.05$) of IFN-γ up to 3-fold and IL-17 up to 13-fold when compared to the rgD + alumen group. The groups that received rgD associated with live spores adsorbed to the alum and inactivated spores adsorbed to the alum presented significant titers ($p<0.05$) of neutralizing antibodies against BoHV-5 when compared to the other groups. The results suggest that *B. toyonensis* spores associated with Bovine herpesvirus type 5 recombinant glycoprotein D in mice showed an immunomodulatory effect, improving the immune response and increasing the immunogenicity of the vaccines.

Key-Words: vaccine; adjuvant; spores; immunomodulation; BoHV-5.

Lista de Figuras

Figura 1 Dinâmica dos níveis de IgG totais de camundongos vacinados com 40µg de rgD de BoHV-5 associados a esporos de *B. toyonensis* ou ao adjuvante alumen..... 36

Figura 2 Perfil de isotipos de imunoglobulinas em camundongos vacinados com 40µg de rgD de BoHV-5 associados a esporos de *B. toyonensis* ou ao adjuvante alumen..... 38

Figura 3 Dinâmica dos níveis de IgG1, IgG2a e IgG2b em camundongos vacinados com 40µg de rgD associados a esporos de *B. toyonensis* ou ao adjuvante alumen..... 39

Figura 4 Transcrição de mRNA das citocinas IL-4, IL-10, IL-17 e IFN-γ em esplenócitos de camundongos vacinados com 40µg de rgD de BoHV-5 associados a esporos de *B. toyonensis* ou ao adjuvante alumen..... 40

Figura 5 Títulos de anticorpos neutralizantes em camundongos vacinados com 40µg de rgD de BoHV-5 associados a esporos de *B. toyonensis* ou ao adjuvante alumen..... 41

Lista de Tabelas

Tabela 1 Distribuição dos grupos experimentais utilizados no trabalho..... 31

Sumário

1 Introdução..... 10

2 Revisão da Literatura..... 12

2.1 Adjuvantes..... 12

2.2 Resposta imune..... 15

2.3 Gênero *Bacillus*..... 19

2.4 *Bacillus* spp. e seu potencial adjuvante..... 21

2.5 Herpesvírus bovino tipo 5..... 24

2.6 Glicoproteína D de herpesvírus bovino tipo 5..... 26

3 Objetivos..... 28

3.1 Objetivo Geral..... 28

3.2 Objetivos Específicos..... 28

4 Metodologia..... 29

4.1 Produção dos esporos de *Bacillus toyonensis*..... 29

4.1.2 Purificação e contagem dos esporos..... 29

4.2 Animais..... 30

4.3 Vacinas..... 30

4.4 Vacinação e delineamento experimental..... 31

4.5 Coleta de sangue..... 31

4.6 Ensaio imunoenzimático (ELISA)..... 32

4.7 Cultivo de células de esplenócitos e extração de RNA..... 33

4.8 Síntese de cDNA e Real Time PCR..... 33

4.9 Soroneutralização..... 34

4.10 Análise estatística..... 34

5 Resultados..... 35

6 Discussão..... 42

7 Considerações Finais..... 47

Referências..... 48

1 Introdução

Compostos que são capazes de estimular a resposta imune contra algum antígeno recebem o nome de adjuvantes. Eles representam um componente importante de diversas vacinas e são capazes de reduzir a quantidade de antígeno utilizado, a quantidade de doses necessárias para induzir uma resposta eficiente contra o antígeno no hospedeiro e aumentar a duração da proteção (KRIEG, 2007; REED et al., 2008). Os adjuvantes podem ser classificados quanto ao seu mecanismo de ação e sua interação com o sistema imune. Eles podem atuar como sistema de entrega de antígenos ou como imunopotenciadores ou imunoestimulantes (SCHWENDENER et al., 2010).

Algumas moléculas de origem bacteriana têm sido avaliadas quanto a sua potencial aplicação como adjuvantes em vacinas devido a suas propriedades imunomoduladoras. 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 induzir uma forte resposta imune humoral e celular no hospedeiro (SOUZA et al., 2014). *Bacillus toyonensis* é uma bactéria Gram positiva, formadora de esporos, não patogênica, que não produz enterotoxinas e não é geneticamente modificada (JIMÉNEZ et al., 2013a). Esse microrganismo foi primeiramente identificado como *B. cereus* var. Toyoi e recentemente foi proposto como uma nova espécie do grupo *B. cereus*, com o nome de *B. toyonensis* (JIMÉNEZ et al., 2013b). É utilizado há várias décadas como probiótico na alimentação animal, melhorando a eficiência alimentar e provendo benefícios a saúde dos animais (GIL-TURNES; CONCEIÇÃO; GIL DE LOS SANTOS, 2007). *Bacillus toyonensis* e outras espécies do gênero *Bacillus* têm sido avaliados quanto a suas propriedades imunomoduladoras e sendo testados como adjuvantes em diversas vacinas veterinárias e humanas (APS et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2012; ROOS et al., 2012; SOUZA et al.,2014).

A vacinação é uma das principais formas de profilaxia e controle de doenças infecciosas (GREENWOOD, 2014). As vacinas baseadas em antígenos recombinantes são mais seguras quando comparadas a vacinas vivas atenuadas, pois não causam reações adversas, como o risco de reversão a virulência, no entanto muitas vezes são pouco imunogênicas e por isso são administradas com adjuvantes para aumentar sua eficácia (MBOW et al., 2010; REED et al., 2008). O BoHV-5 é o causador da meningoencefalite herpética bovina, acarretando grandes perdas econômicas na bovinocultura por acometer principalmente animais mais jovens e ter alto índice de letalidade (CAMPOS et al., 2009). 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 (DUMMER; LEITE; VAN DRUNET DEN HURK, 2014).

Diante da necessidade de novos adjuvantes capazes de aumentar a eficácia de vacinas contra patógenos causadores de doenças nos animais, se faz importante o estudo das propriedades imunomoduladoras de algumas espécies do gênero *Bacillus*, visto que esses microrganismos foram capazes de modular a resposta imune e aumentar a imunogenicidade de vacinas (ROOS et al., 2012; SOUZA et al., 2014; SANTOS et al., 2018). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito adjuvante de esporos de *B. toyonensis* associados a glicoproteína D recombinante de herpesvírus bovino tipo 5 em camundongos.

2 Revisão de Literatura

2.1 Adjuvantes

A palavra adjuvante deriva do latim “adjuvare”, que significa “reforçar”, 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., 2008; MBOW et al., 2010). 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 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 do tipo *Toll* estão sendo testados em vacinas, sendo que o monofosforil lipídeo A (MPL), derivado de lipopolissacarídeo (LPS) da bactéria *Salmonella minnesota* e considerado um agonista de *Toll-like* 4 (TLR-4), 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; CAPRONI; ULMER, 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, emulsões e micropartículas. A segunda geração de adjuvantes é classificada como imunopotenciadores ou imunoestimulantes e são incluídos neste grupo os sais de alumínio, citocinas e agonistas de receptores TLR (SCHWENDENER et al., 2010).

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 células dendríticas (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 as células apresentadoras de antígenos (APCs) (BURAKOVA et al., 2018).

Os virossomos são estruturas víricas desprovidas de material genético que são utilizados em vacinas contra Hepatite A e *Influenzavírus* tipo A e B (RAMBE et al., 2015) e interagem diretamente com linfócitos B e células dendríticas (DCs), que ativam linfócitos T via complexo principal de histocompatibilidade tipo II (MHC II) e aumentam a produção de citocinas como interleucina 2 (IL-2), interferon gama (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 coestimulatórias ou a outros adjuvantes, como a saponina (MONTOMOLI et al., 2011; SHAH; HASSETT; BRITO, 2017).

Os adjuvantes imunopotenciadores estimulam o sistema imune por meio de receptores de padrões microbianos (PRRs), interagindo com receptores do tipo TLR,

RIG-I-like (RLR) ou *NOD-like* (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). Desse modo, induzem a ativação e maturação de macrófagos e DCs e seu recrutamento para o sítio de infecção, aumento da produção de citocinas como as IL-1 e 12 e TNF- α, aumento dos níveis de moléculas coestimulatórias (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 os agonistas de receptores TLR, saponinas, citocinas e os sais de alumínio. As saponinas são glicosídeos esteroides ou triterpenoides encontrados em algumas plantas que vem sendo utilizadas como adjuvantes há alguns anos e melhoram a apresentação e processamento de antígenos para células do sistema imune, como DCs e macrófagos, aumentando a produção de citocinas como IFN-γ e IL-12 e induzindo uma forte resposta imune celular (RAJPUT et al., 2007). O uso de citocinas como adjuvantes tem sido utilizado frequentemente em vacinas veterinárias. 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, 2016). Em aves, a incorporação de IL-18 na vacina contra a doença de Newcasttle estimulou ambas respostas imune celular e humoral, com proliferação de linfócitos T e B (HUNG et al., 2010). Recentemente, a utilização da sequência codificante para IL-18 como adjuvante em uma vacina de DNA contra o vírus da febre aftosa foi testada em bovinos e foi capaz de promover resposta do tipo T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2), com produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN-γ e IL-4, além de altos níveis de anticorpos neutralizantes contra o vírus (KOTLA et al., 2016).

Os agonistas de receptores TLR compreendem uma ampla gama de moléculas, como a citosina fosfoguanosina 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 IL-12 (MONTOMOLI et al., 2011). Além disso, agonistas de TLR-9, como sequências de oligonucleotídeos contendo dinucleotídeos de citosina fosfoguanosina (CpG-ODN) e de TLR-7 e TLR-8,

como os compostos imiquimode e remiquimode, encontram-se em fase de testes *in vivo* e ensaios clínicos (BHARDWAJ; GNJATIC; SAWHNEY, 2010).

Um dos principais exemplos de adjuvantes imunopotenciadores são os sais de alumínio, anteriormente classificado como sistemas de entrega de antígeno (MOREFIELD et al., 2005). Os sais de alumínio são encontrados na forma de fosfato de alumínio, hidróxido de alumínio, ou hidróxido-fosfato de alumínio. Esse composto foi descoberto em 1926 e tem sido utilizado com sucesso há mais de 80 anos como adjuvante em vacinas licenciadas humanas e veterinárias (GLENNY, et al., 1926; LEROUX-ROELS, 2010). Por um tempo, considerou-se seu efeito adjuvante como um depósito no sítio de inoculação, que liberava lentamente o antígeno para reconhecimento pelo sistema imune (MOREFIELD et al., 2005). Atualmente, sabe-se que esses adjuvantes 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 IL-4 e IL-5 (APOSTÓLICO et al., 2016). Dessa forma, esses adjuvantes melhoram a apresentação do antígeno para macrófagos e DCs e auxiliam no recrutamento de células de defesa para os sítios de infecção (AWATE et al., 2013; PASHINE; VALIANTE; ULMER et al., 2005).

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. 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 receptores de reconhecimento de padrões (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 (O'HAGAN & GREGORIO, 2009).

2.2 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 (ALBERTS, et al., 2002). 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 et al., 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 (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

As principais células envolvidas na resposta imune inata são neutrófilos, células natural killer (NK), eosinófilos, basófilos, monócitos, macrófagos e 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 PRRs, internalização e processamento do antígeno, seguido de apresentação de seus peptídeos para os linfócitos T auxiliares (BLACK, et al., 2010). As DCs se originam na medula óssea a partir de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes e dão origem a duas linhagens de DCs: mielóides e linfoides (CONTI; SANTIAGO; SFORCIN; 2014). A linhagem mielóide é formada pelas chamadas DCs convencionais e compreende as células de Langerhans, células dendríticas intersticiais, encontradas na derme, e células dendríticas derivadas de monócitos, consideradas “imaturas”. Essas últimas são encontradas no tecido epitelial, aguardando o contato com o antígeno para migrarem até os linfonodos regionais e apresentarem os peptídeos para os linfócitos T. As células de Langerhans, encontradas em tecidos como pele e mucosa, são de fundamental importância na resposta à infecções de patógenos, visto que esses tecidos são a principal porta de entrada de microrganismos invasores (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

As células da resposta imune inata detectam potenciais patógenos através de seus PRRs (IWASAKI & MEDZHITOV, 2004). No momento em que algum microrganismo atravessa a barreira epitelial e começa a replicar-se nos tecidos, ele é imediatamente reconhecido e detectado pelos macrófagos residentes. Esses macrófagos produzem efeitos importantes ao reconhecer o patógeno, como sua

destruição por fagocitose e a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, que irão promover a ativação de mais macrófagos, recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção e consequente ativação do sistema complemento (KOENDERMAN et al., 2014). O sistema complemento é composto por um conjunto de proteínas solúveis presentes no sangue e em outros líquidos corporais que interagem umas com as outras, gerando uma cascata de reações e mecanismos efetores. Ele pode ser cx ativado pela via clássica, via da lectina ou via alternativa e suas funções consistem na opsonização do microrganismo invasor, induzindo uma série de respostas inflamatórias que ajudam no combate à infecção, além de ter um importante papel na ativação do sistema imune adaptativo (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Algumas classes de PRRs já foram descritos, como os receptores TLRs, receptores *RIG-I-like* (RLRs), receptores *NOD-like* (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 receptores 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 receptores TLRs são altamente conservados entre os mamíferos e são expressos em DCs e macrófagos, podendo atuar como receptores na superfície celular ou intracelularmente (MIYAJI et al., 2011). Receptores como o TLR-4 e TLR-2 estão localizados na superfície celular de 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 TLR-3, TLR-7, TLR-8, TLR-9, TLR-11, TLR-12 e TLR-13, são capazes de reconhecer ácidos nucleicos derivados de vírus e bactérias (KAWASAKI & KAWAI, 2014). Os receptores TLRs, após o reconhecimento de PAMPs, ativam uma cascata de sinalização principalmente através de moléculas adaptadoras como o fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), levando a ativação de quinases e fatores de transcrição e culminando na maturação das células dendríticas (RUECKERT; GUZMAN, 2012). Esse evento vai possibilitar a posterior interação dessas células com os linfócitos T via MHC I e MHC II para dar início a resposta imune adaptativa (IWASAKI & MEDZHITOV, 2004).

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; ARENS; VAN ZELM, 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 coestimulatórias 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 na resposta imune contra microrganismos intracelulares. A resposta é iniciada com macrófagos e DCs que são ativados e secretam IL-12, estimulando a produção de grandes quantidades de interferon γ (IFN-γ) e promove a diferenciação de linfócitos T virgens em linfócitos Th1 (PENG, 2005). 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 IL-4, que atua nos linfócitos B estimulando a produção de IgE e também pela IL-5, que ativa eosinófilos e mastócitos (PAUL & ZHU, 2010). Os linfócitos Th17 secretam a IL-17 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 (OUYANG; KOLLS; ZHENG, 2008). Os linfócitos Treg produzem as citocinas IL-10 e o fator transformador de crescimento β (TGF-β) e tem como função

manter a homeostase e tolerância imunológica, bloqueando a ativação de linfócitos e macrófagos e inibindo a produção de IL-12 (WAN & FLAVELL, 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 representam patógenos oportunistas ou produtores de toxinas para seres humanos e animais, como *Bacillus anthracis* e *Bacillus cereus* (ELSHAGHABBE 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, estas são características fundamentais que permitem a sua vasta utilização como probióticos (ELSHAGHABEE et al., 2017).

O processo de esporulação é um processo de diferenciação celular que ocorre quando começa a 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, denominados célula mãe e 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; DRIKS; EICHENBERGER, 2013; TAN, 2014).

O esporo é formado por estruturas como a capa, as membranas interna e externa, córtex, parede celular germinativa e núcleo (TAN, 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 núcleo 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 à 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 núcleo do esporo contém o material genético, ribossomos e enzimas e grande quantidade de acído dipicolínico, que atua na estabilização do DNA (SETLOW et al., 2006).

Uma das principais aplicações de espécies do gênero *Bacillus* na indústria é o seu uso como probiótico. Esporos de *B. clausii* são utilizados na formulação do produto medicinal Enterogermina®, utilizado para prevenção de diarreia. Os esporos quando germinados no intestino, melhoraram também a resposta imune contra infecções respiratórias em crianças (MARSEGLIA et al., 2007). *Bacillus coagulans* secreta uma bacteriocina (coagulina) com ação regulatória da flora intestinal e é utilizado em produtos como o Sustenex (HYRONIMUS; LE MARREC; URDACI, 1998). *Bacillus subtilis* é uma das espécies mais bem exploradas como probiótico e seus esporos são utilizados em uma grande variedade de produtos como Biosporin e BioPlus®, em associação com *B. licheniformis* (OSIPOVA et al., 2005). Algumas cepas

de *B. cereus* não são patogênicas e são utilizadas na formulação de Bactisubtil® e Biovicerin, suplementos medicinais para o uso em humanos.

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 et al., 2013a). 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 et al., 2013b). 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 (WILLIANS et al., 2009).

2.4 *Bacillus* spp. e seu potencial adjuvante

As bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, além de serem utilizadas como probiótico, apresentam potencial para serem utilizadas como adjuvantes de vacinas (ROOS et al., 2012). Estudos têm demonstrado o potencial de *Bacillus firmus* como adjuvante de mucosa de vacinas virais. *Bacillus firmus* não é patogênico, não produz esporos e tem propriedades imunomoduladoras (ZIDEK et al., 1998; PROKEŠOVA et al., 1994;). As propriedades imunomoduladoras de *B. firmus* foram observadas após administração via intratraqueal e intranasal e produção de anticorpos antígeno-específicos em camundongos (MLCKOVÁ, et al. 2001). A administração de *B. firmus* em cobaias por via intranasal aumentou a produção de anticorpos neutralizantes contra *Influenzavírus* tipo B (HAVLÍKOVÁ et al., 2008). *Bacillus firmus* também demonstrou ser um adjuvante de mucosa eficiente em camundongos, estimulando a produção de citocinas como IFN-γ, IL-6 e IL-10 e acelerando e prolongando a resposta antiviral (ZANVIT et al., 2010).

Esporos de *B. subtilis* também apresentam potencial adjuvante em 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 de HIV promoveu um aumento nos níveis de anticorpos após a administração em camundongos pela via subcutânea, melhorando a imunogenicidade do antígeno. 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. (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).

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). Esporos de *B. subtilis* apresentando o fragmento C da toxina tetânica em sua superfície obtiveram resultados promissores. Quando administrados via oral e nasal em camundongos, demonstraram altos níveis 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, IL-2 e IL-6, indicando o desenvolvimento de uma resposta Th1/Th2 balanceada (SONG et al., 2012).

Bacillus atrophaeus também tem sido avaliado quanto ao seu potencial adjuvante (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 & 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, quadriplicando o valor quando comparados a administração dos adjuvantes separadamente (NASCIMENTO et al., 2012).

Bacillus toyonensis apresentou potencial adjuvante quando administrado como probiótico por via oral em camundongos vacinados com uma vacina experimental inativada contra o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) (ROOS et al., 2012). Os camundongos suplementados com o probiótico apresentaram um aumento dos níveis de IgG total e das citocinas IFN-γ, IL-12 e IL-10, sugerindo o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1. 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). Camundongos suplementados com *B. toyonensis* durante dois períodos diferentes e vacinados contra o BoHV-5 demonstraram aumento nos níveis de IgG total quando comparados com animais que

não receberam o probiótico. Os animais suplementados também apresentaram maiores títulos de anticorpos neutralizantes e de isotipos IgG1 e IgG2a, sugerindo o desenvolvimento de uma resposta imune balanceada Th1/Th2. O efeito imunomodulador de *B. toyonensis* também foi observado nos animais que receberam doses de $2x10^3$ UFC de esporos vivos e inativados administrados via subcutânea simultaneamente à vacina, com produção de altos níveis de anticorpos IgG totais e anticorpos neutralizantes contra o vírus. (SANTOS et al., 2016). Recentemente, o efeito do probiótico *B. toyonensis* foi verificado na modulação da resposta imune de camundongos quando vacinados com a glicoproteína D recombinante de BoHV-5 e suplementados com o probiótico em dois períodos diferentes (SANTOS, et al., 2018). Os animais suplementados apresentaram um aumento de IgG total, anticorpos neutralizantes contra o vírus e dos isotipos IgG1 e IgG2a quando comparados com o grupo não suplementado. Os camundongos que receberam o probiótico também apresentaram altos níveis de transcritos de genes de citocinas pró-inflamatórias como IL-4 e IL-12, demonstrando que *B. toyonensis* foi eficaz na produção de uma resposta humoral e celular.

2.5 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 MEDICO JAZAC et al., 2003). O BoHV-5 é o causador da meningoencefalite herpética em bovinos, doença caracterizada por ter 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 de 70 a 100%, causando necrose do córtex cerebral e acarretando anualmente em grande prejuízo econômico para a bovinocultura. (VOGEL et al., 2003; CAMPOS et al., 2009).

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 o atracamento e penetração do vírus na célula. (ROIZMAN & PELLET, 2013).

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).

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 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). Em estudos anteriores, foi analisada a imunogenicidade e eficácia de vacinas inativadas de BoHV-1 e BoHV-5, que foram desafiadas frente ao BoHV-5 (DEL MÉDICO JAZAC 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 JAZAC et al., 2006).

Diversas abordagens e estratégias vacinais tem sido estudadas para controlar a infecção causada pelo BoHV-5, sendo a grande maioria baseada nas proteínas do envelope viral, por se encontrarem na superfície do patógeno e serem alvo principal do sistema imune do hospedeiro (DUMMER et al., 2014). Sabe-se que pelo menos seis proteínas estão envolvidas no processo de atracamento do vírus à célula, sendo elas as proteínas gC, gB, gD, gH, gK e gL. A glicoproteína gD é essencial para a fusão do envelope viral e sua entrada na célula e está presente no envelope viral BoHV-1 e BoHV-5 (GERAGHTY; JOGGER; SPEAR, 2000).

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) (DUMMER; LEITE; DEN HURK, 2014). A gD é importante na 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, 1996). Anticorpos anti-gD são reconhecidos por células NK e podem estimular a citotoxicidade celular mediada por anticorpo (ADCC) (BABIUK et al., 1987). A resposta imune inata contra o vírus leva posteriormente ao desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa, na qual a proteína gD também torna-se alvo de linfócitos T citotóxicos em bovinos, além de ser capaz de estimular linfócitos T CD4+ (SPLITTER; ESKRA; ABRUZZINI, 1988).

2.6 Glicoproteína D de herpesvírus bovino tipo 5

A gD de BoHV-5 codifica 417 aminoácidos, distribuídos em um peptídeo sinal de 18 aa, um domínio extracelular e uma região transmembrana, e possui um peso 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 e induzindo uma forte resposta imune humoral e celular durante a infecção (DUMMER; LEITE; VAN DRUNET DEN HURK, 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. 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 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 epítopos 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 IL-17

(DUMMER et al., 2014). A rgD também foi capaz de gerar anticorpos neutralizantes quando associada a adjuvantes oleosos em bovinos (ARAÚJO, 2014).

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 (DUMMER; LEITE; VAN DRUNET DEN HURK, 2014).

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

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

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a dinâmica dos níveis de IgG totais e perfil de isotipos IgG (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 BoHV-5 através do ensaio de soroneutralização;

Avaliar os níveis de transcrição de mRNA das citocinas IL-4, IL-10, IL-17 e IFN-γ nos esplenócitos murinos.

4 Metodologia

4.1 Produção dos esporos de *Bacillus toyonensis*

O microrganismo *B. toyonensis* utilizado neste experimento pertence à coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia do Núcleo de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Inicialmente, *B. toyonensis* foi semeado em meio BHI ágar (Brain Heart Infusion, Difco) e incubado por 24 horas à temperatura de 37 °C. Após o crescimento, colônias isoladas foram inoculadas em Erlenmayers de 125 mL contendo 10 mL de meio LB (Luria-Bertani) e incubados em agitador orbital por 18 horas a 37 °C com agitação constante de 200rpm. Esses cultivos foram inoculados em 90 mL de meio F (FOERSTER & FOSTER, 1966) e incubados em agitador orbital por 96 horas a 37 °C. Os cultivos foram centrifugados a 10.000 x g em centrífuga Sorvall® RC™ durante 10 minutos, lavados 1x com solução salina fosfatada (PBS) e após nova centrifugação nas mesmas condições, concentrados a um volume final de 20 mL. Após, a suspensão final foi aquecida 68 °C em banho maria por 3 horas para eliminação de células vegetativas.

4.1.2 Purificação e contagem dos esporos

A purificação dos esporos de *B. toyonensis* foi realizada conforme protocolo descrito anteriormente por Tavares et al. (2013) com modificações. O método consistiu nas seguintes etapas: o cultivo de esporos foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 x g a temperatura de 4 °C. Após, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* suspenso com um volume de 50 mM de Tris HCl (pH 7,2) contendo 50 µg/mL de lisozima e a solução foi incubada durante 1 hora a 37 °C sob agitação. Após esse período, o cultivo foi centrifugado novamente, lavado 1x com água destilada e suspenso em uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,05%. Uma nova centrifugação foi realizada, seguida de 2 lavagens com água destilada e suspensão do cultivo em 20 mL de água destilada.

A coloração de Wirtz-Conklin (WIRTZ, 1908; CONKLIN, 1934) foi utilizada para avaliar a frequência de esporulação após a purificação. A técnica foi realizada a partir do preparo de esfregaço do cultivo e sua fixação em lâmina pelo calor, adição do corante verde malaquita e repouso da lâmina sobre um recipiente com água a 65 °C de modo que ocorresse emissão de vapores, mantendo o corante aquecido por 5 minutos. Após, foi lavado com água destilada, adicionada solução de safranina por 30 segundos e observado ao microscópio com objetiva de imersão, sendo possível a identificação de esporos na coloração verde e outras estruturas, como células vegetativas, em vermelho. A pureza dos esporos foi avaliada de acordo com a presença de células vegetativas, conforme descrito por Vogel et al. (2008). Após a purificação, o cultivo foi titulado por meio das técnicas de diluição seriada e semeadura por espalhamento com alça de Drigalski em placas de Petri, contendo meio BHI ágar (Brain Heart Infusion, Difco). As placas foram incubadas a 37 °C por 18 horas e após o tempo estabelecido foi feita a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Após realizada a contagem, a suspensão de esporos foi armazenada a - 20 °C até o momento de formulação das vacinas.

4.2 Animais

Foram utilizados 64 camundongos *Swiss*, fêmeas de 4 a 6 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da UFPel. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno de 414x344x168mm autoclaváveis (ALESCO, Brasil), sem restrição de alimentação ou água. Todos os procedimentos realizados estão de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPel (projeto número 1981).

4.3 Vacinas

As vacinas foram formuladas utilizando a glicoproteína D recombinante (rgD) de herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) expressa na levedura *Pichia pastoris* (DUMMER et al., 2009). Para formulação das vacinas foi utilizado 40 µg de rgD por dose, solução salina fosfatada (PBS), $2x10^9$ UFC de esporos de *B. toyonensis* e Hidróxido de Alumínio (alumen) (Sigma-Aldrich). Para preparar a dose do antígeno

associado com esporos vivos foi utilizado 40 µg de rgD (DUMMER et al., 2014) associada com $2x10^9$ UFC de esporos viáveis de *B. toyonensis*, adsorvidos ou não em 10% de alumen. Para preparar as doses do antígeno associado com esporos inativados, uma suspensão contendo $2x10^9$ UFC de esporos viáveis foi autoclavada a 121 °C durante 30 minutos e depois associada com 40 µg de rgD, adsorvidos ou não em 10% de alumen. Foram administradas duas doses de vacina, com volume de 200 µL, pela via subcutânea nos dias 0 e 21 do experimento.

4.4 Vacinação e delineamento experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos experimentais, contendo 10 animais cada grupo. Os grupos foram denominados rgD + esp. vivo, rgD + esp. inat, rgD + esp. vivo + alumen, rgD + esp. inat + alumen, rgD + alumen e rgD + PBS. A tabela 1 apresenta a distribuição dos grupos experimentais. O grupo rgD + esp. vivo recebeu 2×10^9 UFC de esporos viáveis de *B. toyonensis* associados com 40 µg de rgD. O grupo rgD + esp. inat recebeu 2×10^9 UFC de esporos inativados associados com 40 µg de rgD. O grupo rgD + esp. vivo + alumen recebeu 2×10^9 UFC de esporos associados com 40 µg de rgD adsorvidos em 10% de alumen. O grupo rgD + esp. inat + alumen recebeu $2x10^9$ UFC de esporos inativados associados com 40 µg de rgD adsorvidos em 10% de alumen. O grupo rgD + alumen recebeu 40 µg de rgD adsorvidos em 10% de alumen. O grupo rgD + PBS recebeu 40 µg de rgD em solução salina fosfatada pH 7,4 (PBS).

Tabela 1 – Distribuição dos grupos experimentais utilizados no trabalho

Grupo	Esporos	Vacina
rgD+esp. vivo	$2x10^9$ UFC esporos vivos	rgD + esporos vivos
rgD+esp. inat	$2x10^9$ UFC esporos inativados	rgD + esporos inativados
rgD+esp.vivo+alumen	$2x10^9$ UFC esporos vivos	rgD + esporos vivos + alumen
rgD+esp.inat+alumen	$2x10^9$ UFC esporos inativados	rgD + esporos inativados + alumen
rgD+alumen	-	rgD + alumen
rgD+PBS	-	rgD + PBS

4.5 Coleta de sangue

As amostras de sangue dos camundongos foram coletadas a partir da punção do plexo venoso submandibular nos dias 0, 21, 28, 35 e 42 do experimento. Após a

coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas e o soro separado, identificados individualmente e armazenados a – 20 °C até o momento de realização das análises.

4.6 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

O ELISA indireto foi realizado segundo Dummer et al. (2014) com modificações. Os soros foram testados para IgG total, IgG1, IgG2a e IgG2b. As análises de IgG total foram realizadas por meio de titulação dos soros individuais dos animais de cada grupo coletados nos dias 0, 21, 28, 35 e 42. Para realizar a titulação, as amostras de soro individuais dos animais dos dias 0, 21, 28, 35 e 42 foram diluídas em série na base 2 iniciando em 1:20 até 1:40.960. Placas de microtitulação de 96 poços foram sensibilizadas com 50ng de rgD por poço em tampão Carbonato-Bicarbonato, permanecendo durante a noite a 4 ºC. As placas foram lavadas três vezes com 200µL por poço de PBS (pH 7,4) contendo 0,05 % de Tween 20 (PBS-T). Posteriormente foram adicionados 100µL por poço de cada amostra de soro diluída em PBS-T e as placas foram incubadas durante 1 hora, a 37 ºC. Após três lavagens com 200 µL de PBS-T por poço, foi adicionado 100µL por poço de conjugado de anticorpos IgG anti-mouse (Sigma-Aldrich, SP) diluído 1:4.000 em PBS, seguido por incubação a 37 ºC durante 1 hora e meia. Após cinco lavagens nas mesmas condições anteriores, foi adicionado 100 µL por poço de solução de revelação (10mL de tampão para substrato, 0,004g de Ortho-Phenylenediamine (OPD) e 15µL de H_2O_2) deixando reagir por 15 minutos no escuro a temperatura ambiente. A reação foi interrompida adicionando-se 50 µL por poço de H_2SO_4 a 3%. As absorbâncias foram medidas a 492 nm usando-se um leitor de microplacas EZ Read 400 (Biochrom, UK). Os resultados da titulação foram expressos como o recíproco da diluição mais elevada, que resultou em absorbâncias de três desvios padrão acima do valor do soro controle negativo (coleta do dia 0). Para isotipagem de IgG1, IgG2a e IgG2b foram utilizados *pools* de soros dos grupos experimentais, coletados nos dias 0, 28, 35 e 42, diluídos 1:200. A técnica foi realizada de acordo com as instruções do kit de isotipagem (Sigma–Aldrich). Os resultados foram expressos como a média das absorbâncias obtidas das amostras em triplicata.

4.7 Cultivo de células de esplenócitos e extração de RNA

Os camundongos de todos os grupos experimentais foram eutanasiados no dia 42 do experimento, seu baço coletado e macerado. As células do baço ($2x10^6$) foram cultivadas em 1 mL de meio RPMI 1640 (Gibco) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e agentes antibióticos e antifúngicos (penicilina 10,000 U/ml, estreptomicina a 10 mg/mL e anfotericina B a 25 mg/mL) (Gibco) em placas de 24 poços (Kasvi, Taiwan, China), e incubadas 24 horas a 37 ºC em estufa com 5% de gás carbônico (CO_2). Após 24 horas, o meio foi renovado e as células estimuladas com 10 µg de rgD, 10 µg de concanavalina A (ConA, Sigma-Aldrich), com meio RPMI 1640 e incubadas por 18 horas sob as mesmas condições anteriores. A ConA e o meio foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. Dado o tempo de incubação, o sobrenadante foi descartado, as células coletadas com o reagente TRIzol® (Sigma-Aldrich) e armazenadas a -70 ºC até o momento de extração do RNA. Foi utilizado o método de extração por TRIzol, de acordo com as instruções do fabricante.

4.8 Síntese de cDNA e Real Time PCR

Foi utilizado 400ng de RNA para a síntese de cDNa e a reação foi feita de acordo com instruções do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A reação quantitativa em cadeia de polimerase (qPCR) foi realizada na plataforma CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad) como descrito por de Avila et al. (2016) e foi analisada a quantidade de transcritos de mRNA das citocinas IL-4, IL-10, IL-17 e IFN-γ. Os genes β-actina e GAPDH foram utilizados como genes de referência, sendo que a β-actina foi escolhida baseada em sua eficiência (valores de 1,8 e 1,98 para GAPDH e β-actina, respectivamente). As sequências dos primers utilizados para a amplificação do gene das citocinas, β-actina e GAPDH, bem como as condições da reação foram anteriormente descritas (CARDONA et al., 2009; DUMMER et al., 2014). Todas as amostras foram analisadas em triplicata. A partir dos valores de Threshold Cycle (Ct) obtidos foi calculada a expressão relativa dos genes pela comparação com a expressão da β-actina, de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ descrito por Livak and Schmittgen (2001).

4.9 Soroneutralização

As amostras de soros dos grupos experimentais foram testadas para a presença de anticorpos neutralizantes contra o BoHV-5 através da técnica de soroneutralização (SN), segundo Fischer et al. (2007). Um *pool* dos soros de cada grupo foi diluído em série na base 2, iniciando em 1:2 até 1:256 em meio essencial mínimo (MEM). Em seguida, 25 µL de cada diluição foram aplicados em placas de poliestireno de 96 poços. Após a distribuição do soro diluído em cada poço, foram adicionados 25 µL de uma suspensão de vírus BoHV-5 contendo 100 doses virais infectantes para cultivo celular (CCID50%), seguido de incubação durante 1 hora a 37 °C em estufa com 5% de CO_2. Em seguida, foram adicionadas $3x10^4$ células de linhagem de rim bovino (MDBK) por orifício. As microplacas foram novamente incubadas durante 72 horas. A presença de anticorpos neutralizantes resulta na ausência de efeito citopático do vírus. Os títulos de anticorpos foram calculados pelo método estatístico de Behrens e Kärben e expressos como o recíproco da diluição mais elevada capaz de neutralizar 100 CCID50% do vírus.

4.10 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados com auxílio do programa *GraphPad Prism 7* (GraphPad Software, CA, USA). Os valores dos títulos de anticorpos totais e dos isotipos dos soros dos animais de cada grupo experimental, obtidos pelo ELISA indireto, foram transformados para log10 e submetidos a análise de variância (two-way ANOVA), seguido pelo Teste de Tukey. As diferenças encontradas nos títulos de anticorpos neutralizantes do soro e na expressão relativa de citocinas foram avaliadas utilizando one-way ANOVA, seguido pelo Teste de Dunnett's. Os dados foram comparados entre si e foi considerada diferença estatística quando $p<0,05$.

5 Resultados

Os animais de todos os grupos experimentais responderam à vacina com a produção de imunoglobulinas G (IgG) totais. A figura 1 mostra a dinâmica dos níveis totais de IgG. A associação de esporos de *B. toyonensis* vivos e inativados a rgD e adsorvidos ou não ao hidróxido de alumínio (alumen) foi capaz de estimular a produção de títulos de anticorpos anti-rgD superiores ($p<0,05$) quando comparados ao grupo controle (rgD + alumen). No dia 21, o grupo rgD + esp. vivo apresentou níveis de IgG cerca de 6.4 vezes maiores ($p<0,05$) que o grupo rgD + PBS (Figura 1A). O grupo rgD + esp. vivo + alumen apresentou níveis superiores ($p<0,05$) de IgG de 4.6 vezes quando comparado ao grupo rgD + alumen e apresentou níveis semelhantes ($p>0,05$) quando comparado ao grupo rgD + esp. inat + alumen (Figura 1B). O grupo rgD + esp. inat + alumen apresentou níveis de IgG semelhantes ($p>0,05$) quando comparado ao grupo rgD + alumen (Figura 1B). No dia 28, o grupo rgD + esp. vivo apresentou níveis de IgG cerca de 20 vezes maiores ($p<0,05$) quando comparado ao grupo rgD + PBS (Figura 1A). O grupo rgD + esp. vivo + alumen apresentou níveis de IgG 7.5 vezes superiores ($p<0,05$) ao grupo rgD + alumen e níveis semelhantes ($p>0,05$) quando comparado ao grupo rgD + esp. inat + alumen (Figura 1B). O grupo rgD + esp. inat + alumen apresentou níveis de IgG cerca de 4.5 vezes maiores ($p<0,05$) quando comparado ao grupo rgD + alumen (Figura 1B). No dia 35, o grupo rgD + esp. vivo apresentou níveis de IgG cerca de 36 vezes maiores ($p<0,05$) quando comparado ao grupo rgD + PBS. O grupo rgD + esp. vivo + alumen apresentou níveis de IgG 6.2 vezes superiores ($p<0,05$) quando comparado ao grupo rgD + alumen e níveis semelhantes ($p>0,05$) quando comparado ao grupo rgD + esp. inat + alumen. O grupo rgD + esp. inat + alumen apresentou níveis de IgG cerca de 12 vezes maiores ($p<0,05$) quando comparado ao grupo rgD + alumen. No dia 42, o grupo rgD + esp. vivo apresentou níveis de IgG 40 vezes superiores ($p<0,05$) quando comparado ao grupo rgD + PBS. O grupo rgD + esp. vivo + alumen apresentou níveis de IgG cerca de 2.6 vezes maiores ($p<0,05$) quando comparado ao grupo rgD + alumen e níveis semelhantes ($p>0,05$) quando comparado ao grupo rgD + esp. inat + alumen. O grupo

rgD + esp. inat + alumen apresentou níveis de IgG cerca de 5.8 vezes maiores (p<0,05) quando comparado ao grupo rgD + alumen.

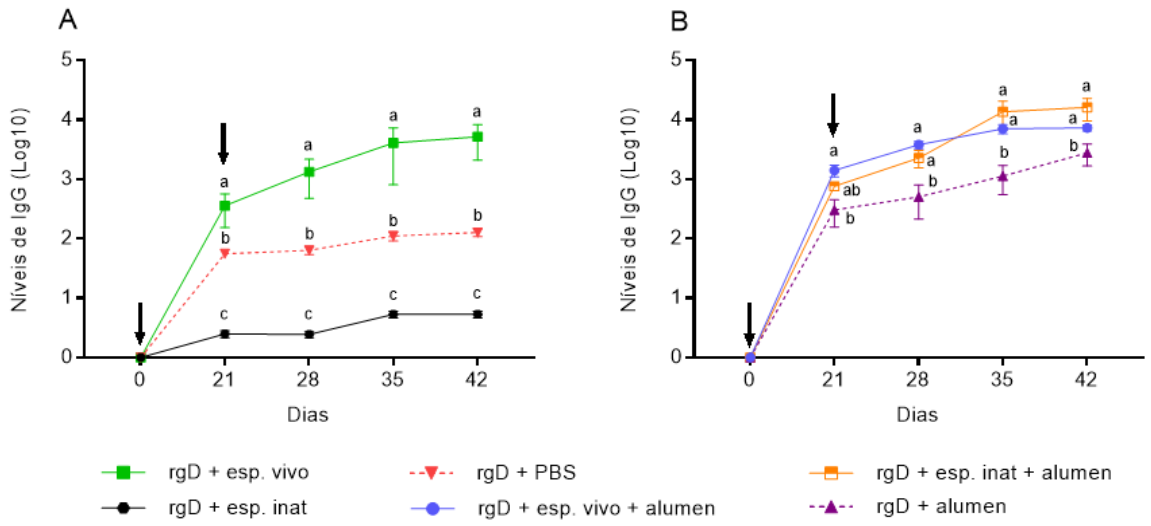

Figura 1 – Dinâmica dos níveis de IgG totais de camundongos vacinados com 40 µg de rgD de BoHV-5 associados a esporos de *B. toyonensis* ou ao adjuvante alumen. Os dados foram representados como os valores das médias transformados para log10 e foram expressos como o recíproco da diluição mais elevada em que a absorbância a 492 nm foi maior do que a leitura de três desvios padrão acima do valor do soro controle negativo. As flechas indicam as vacinações nos dias 0 e 21, respectivamente. (A) Níveis de IgG dos grupos experimentais rgD +esp. vivo, rgD + PBS e rgD + esp. inat. (B) Níveis de IgG dos grupos experimentais rgD + esp. vivo + alumen, rgD + esp. inat + alumen e rgD + alumen. A análise estatística foi realizada pelo teste two-way ANOVA seguido de teste de Tukey. As letras iguais significam que não há diferença estatística (p>0,05) e letras diferentes significam diferença estatística (p<0,05) entre os grupos experimentais nos dias (21, 28, 35 e 42).

O perfil de isotipos IgG foi determinado nos dias 28, 35 e 42 do experimento. A figura 2 mostra o perfil de isotipos de imunoglobulinas IgG1, IgG2a e IgG2b. Quando avaliada a dinâmica dos níveis de IgG1 (Figura 2A), verificou-se que no dia 28 o grupo rgD + esp. vivo apresentou níveis semelhantes desse isotipo (p>0,05) quando comparado ao grupo rgD + alumen, níveis semelhantes (p>0,05) aos grupos rgD + esp. vivo + alumen e rgD + alumen no dia 35 e níveis mais baixos (p>0,05) quando comparado aos demais grupos experimentais no dia 42. O grupo rgD + esp. vivo + alumen apresentou maiores níveis de IgG1 (p<0,05) quando comparado aos demais grupos experimentais no dia 28, níveis semelhantes (p>0,05) aos grupos rgD + esp. vivo e rgD + alumen no dia 35 e níveis superiores (p<0,05) aos grupos rgD + esp. vivo

e rgD + alumen e semelhantes (p>0,05) quando comparado ao grupo rgD + esp. inat + alumen no dia 42. O grupo rgD + esp. inat + alumen apresentou níveis superiores de IgG1 (p<0,05) quando comparado ao grupo rgD + esp. vivo e semelhantes (p>0,05) ao grupo rgD + alumen no dia 28, níveis maiores (p<0,05) quando comparados aos grupos rgD + esp. vivo e rgD + esp. vivo + alumen e semelhantes (p>0,05) ao grupo rgD + alumen no dia 35, e níveis superiores (p<0,05) quando comparado aos grupos rgD + esp. vivo e rgD + alumen e semelhantes (p>0,05) ao grupo rgD + esp. vivo + alumen no dia 42.

Quando avaliada a dinâmica dos níveis de IgG2a (Figura 2B), foi verificado que o grupo rgD + esp. vivo apresentou maiores níveis desse isotipo (p<0,05) quando comparado aos grupos rgD + esp. inat + alumen e rgD + alumen no dia 28, níveis superiores (p<0,05) quando comparado aos demais grupos experimentais no dia 35 e níveis superiores (p<0,05) aos grupos rgD + esp. inat + alumen e rgD + alumen e semelhantes (p>0,05) ao grupo rgD + esp. vivo + alumen no dia 42. O grupo rgD + esp. vivo + alumen apresentou níveis maiores desse isotipo (p<0,05) quando comparado aos grupos rgD + esp. inat + alumen e rgD + alumen no dia 28, níveis superiores (p<0,05) quando comparado ao grupo rgD + alumen e semelhantes (p>0,05) ao grupo rgD + esp. inat + alumen no dia 35 e níveis maiores (p<0,05) quando comparado ao grupo rgD + alumen e semelhantes (p>0,05) aos grupos rgD + esp. vivo e rgD + esp. inat + alumen no dia 42. O grupo rgD + esp. inat + alumen apresentou maiores níveis de IgG2a (p<0,05) quando comparado ao grupo rgD + alumen nos dias 28, 35 e 42 e níveis semelhantes (p>0,05) quando comparado ao grupo rgD + esp. vivo + alumen nos dias 35 e 42.

Já na dinâmica dos níveis de IgG2b (Figura 2C), foi observado que o grupo rgD + esp. vivo apresentou níveis maiores (p<0,05) desse isotipo quando comparado ao grupo rgD + alumen nos dias 28 e 35 e semelhantes (p>0,05) quando comparado ao grupo rgD + alumen no dia 42. O grupo rgD + esp. vivo + alumen apresentou níveis de IgG2b superiores (p<0,05) quando comparado aos demais grupos experimentais no dia 28, níveis superiores (p<0,05) aos grupos rgD + esp. vivo e rgD + alumen nos dia 35 e 42 e semelhantes (p>0,05) ao grupo rgD + esp. inat + alumen no dia 42. O grupo rgD +esp. inat + alumen apresentou níveis maiores (p<0,05) quando comparado aos grupos rgD + esp. vivo e rgD + alumen no dia 28, níveis superiores (p<0,05) quando comparado aos demais grupos experimentais no dia 35 e níveis superiores

(p<0,05) aos grupos rgD + esp. vivo e rgD + alumen e semelhantes (p>0,05) ao grupo rgD +esp. vivo + alumen no dia 42.

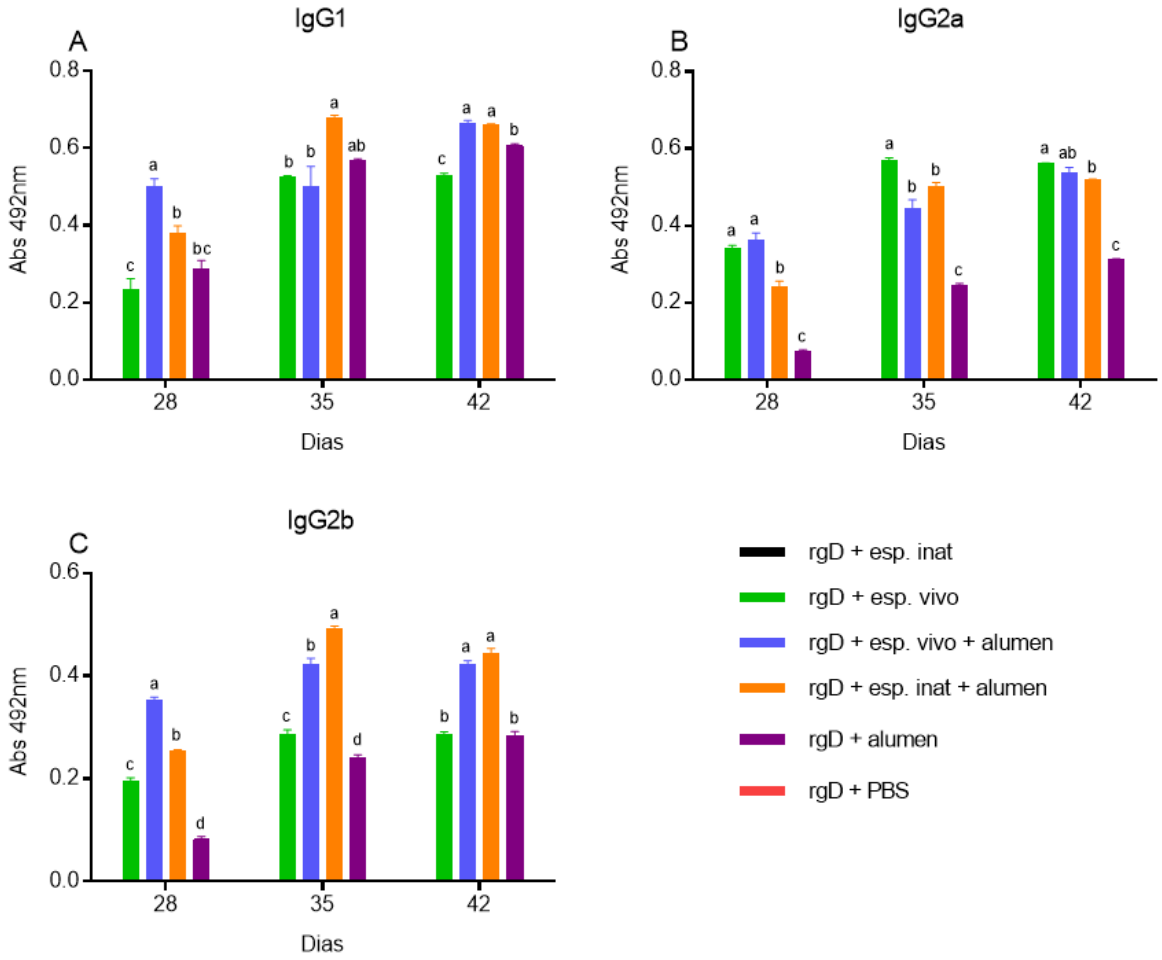

Figura 2 - Perfil de isotipos de imunoglobulinas em camundongos vacinados com 40 µg de rgD de BoHV-5 associados a esporos de *B. toyonensis* ou ao adjuvante alumen. Os dados representam as médias (± E.P.M) dos valores de absorbâncias obtidas pelo ELISA indireto dos soros coletados dos animais nos dias 28, 35 e 42 do experimento. (A) Níveis de IgG1. (B) Níveis de IgG2a. (C) Níveis de IgG2b. As letras iguais significam que não há diferença estatística (p>0,05) e letras diferentes significam diferença estatística (p<0,05) entre os grupos experimentais.

As razões IgG2a/IgG1e IgG2b/IgG1 foram avaliadas após a segunda dose da vacina. O grupo rgD + esp. vivo obteve razão IgG2a/IgG1 de 1.5 no dia 28, se mantendo no valor de 1 nos dias 35 e 42 (Figura 3A) e razão IgG2b/IgG1 de 0.8, que se manteve nos dias 35 e 42. O grupo rgD + esp. vivo + alumen apresentou razão IgG2a/IgG1 de aproximadamente 0.7 no dia 28 aumentando para 0.8 nos dias 35 e 42 (Figura 3A) e razão IgG2b/IgG1 de 0.7 no dia 28, que obteve valores de 0.8 e 0.6

nos dias 35 e 42, respectivamente (Figura 3B). O grupo rgD + esp. inat + alumen apresentou uma razão IgG2a/IgG1 de 1 no dia 28, diminuindo para 0.9 no dia 35 e se mantendo até o dia 42 (Figura 3A) e razão IgG2b/IgG1 que se manteve em 0.6 durante os dias 28, 35 e 42 (Figura 3B). Os valores das razões IgG2a/IgG1 e IgG2b/IgG1 dos grupos que receberam a vacina contendo os esporos na formulação foram superiores (p<0,05) quando comparados aos valores da razão do grupo rgD + alumen nos dias 28, 35 e 42.

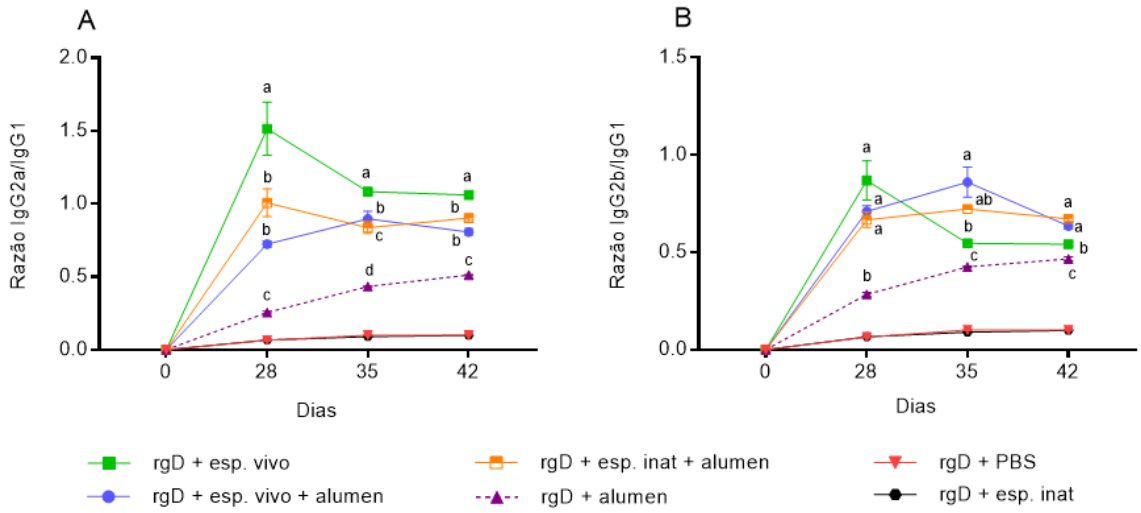

Figura 3 – Dinâmica dos níveis de IgG1, IgG2a e IgG2b em camundongos vacinados com 40 µg de rgD associados a esporos de *B. toyonensis* ou ao adjuvante alumen. (A) Razão IgG2a/IgG1. (B) Razão IgG2b/IgG1. As letras iguais significam que não há diferença estatística (p>0,05) e letras diferentes significam diferença estatística (p<0,05) entre os grupos experimentais.

Os esplenócitos dos camundongos dos grupos experimentais que receberam esporos de *B. toyonensis* vivos e inativados adsorvidos ou não ao alumen na formulação vacinal, submetidas ao estímulo com a rgD apresentaram um perfil distinto de transcrição de mRNA das citocinas IL-4, IL-10, IL-17 e IFN-γ (Figura 4). Os esplenócitos dos animais do grupo rgD + esp. vivo mostraram níveis de transcrição de mRNA de IFN-γ 3 vezes maiores (p<0,05) quando comparado ao grupo controle (rgD + alumen). Os esplenócitos dos camundongos do grupo rgD + esp. vivo + alumen apresentaram níveis da transcrição de mRNA de IL-17 13 vezes maiores (p<0,05) quando comparado ao grupo controle. Já os esplenócitos dos camundongos do grupo rgD + esp. inat + alumen mostraram níveis de transcrição de mRNA de IL-17 4 vezes

maiores (p<0,05) e IFN-γ 3 vezes maiores (p<0,05), quando comparados ao grupo rgD + alumen. A transcrição de mRNA das citocinas IL-4 e IL-10 de esplenócitos dos grupos que receberam a vacina contendo esporos adsorvidos ou não ao alumen na formulação não apresentaram níveis significativos (p>0,05) de transcrição de mRNA quando comparados ao grupo rgD + alumen.

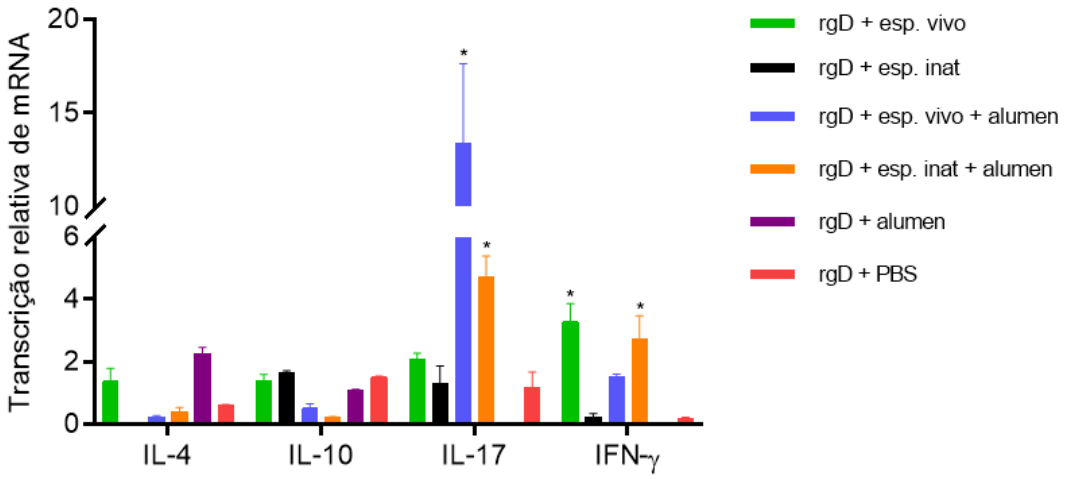

Figura 4 – Transcrição de mRNA das citocinas IL-4, IL-10, IL-17 e IFN-γ em esplenócitos de camundongos vacinados com 40 µg de rgD de BoHV-5 associados a esporos de *B. toyonensis* ou ao adjuvante alumen. As células foram estimuladas *in vitro* com a rgD durante 18 horas. O RNA total foi extraído e o cDNA submetido ao qPCR. A transcrição relativa dos genes IL-4, IL-10, IL-17 e IFN-γ foi calculada a partir dos valores do Threshold Cycle (Ct), através da comparação com a transcrição do gene endógeno β-actina de referência. Os resultados foram expressos como as médias ± E.P.M. Os asteriscos significam que há diferença estatística entre os grupos rgD + esp. vivo, rgD + esp. vivo + alumen e rgD + esp. inat + alumen e o controle. Análise estatística realizada por one-way ANOVA seguida pelo teste de Dunnett's. *p<0,05.

Os títulos de anticorpos neutralizantes contra o BoHV-5 foram determinados no dia 42 do experimento. A figura 5 mostra os títulos de anticorpos neutralizantes nos grupos experimentais. Os grupos rgD + esp. vivo + alumen e rgD + esp. inat + alumen apresentaram títulos maiores (p<0,05) quando comparados ao grupo controle (rgD + alumen). Os demais grupos experimentais não apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes.

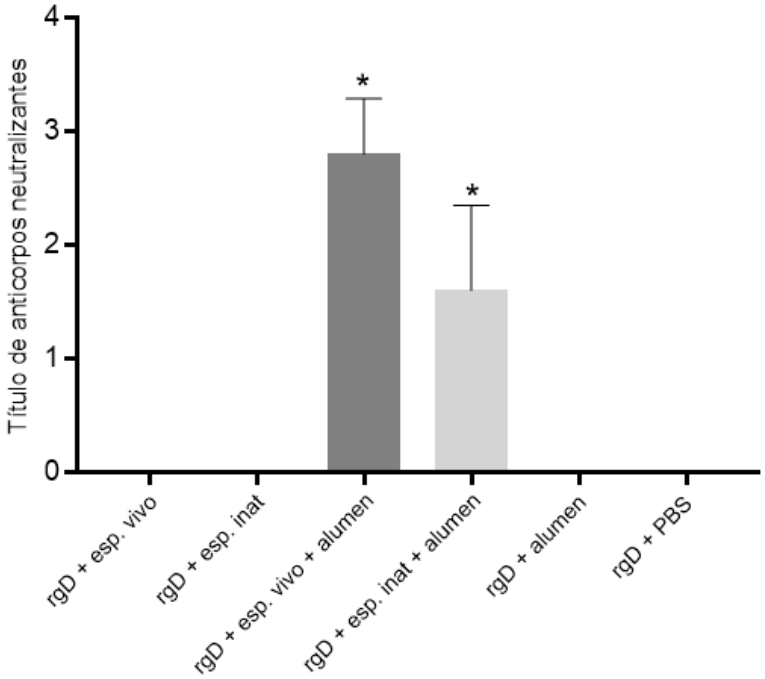

Figura 5 – Título de anticorpos neutralizantes em camundongos vacinados com 40 µg de rgD de BoHV-5 associados a esporos de *B. toyonensis* ou ao adjuvante alumen. Os dados representam a média ± E.P.M dos títulos de anticorpos neutralizantes contra BoHV-5 determinados pela técnica de soroneutralização dos soros do dia 42 do experimento. A análise estatística foi realizada por one-way ANOVA seguido do teste de Dunnett's. *p<0,05.

6 Discussão

No presente trabalho, foi avaliado o uso de esporos de *B. toyonensis* como adjuvante de uma vacina, baseada na rgD de BoHV-5, em camundongos. Os dados obtidos mostraram que os animais que receberam a vacina contendo esporos apresentaram níveis significativamente maiores de IgG total quando comparados aos grupos que não receberam esporos na formulação vacinal, sugerindo que os esporos foram capazes de estimular a resposta imune contra o antígeno administrado. O microrganismo *B. toyonensis* é um probiótico utilizado na alimentação animal na formulação do produto TOYOCERIN® e grande parte da informação acerca de suas propriedades imunomoduladoras foram estudadas a partir da sua administração pela via oral (COPPOLA et al., 2005; WILLIANS et al., 2009; ROOS et al., 2012).

Esporos de *B. subtilis* já foram investigados quanto ao seu mecanismo de ação na modulação da resposta imune (SOUZA et al., 2014). Eles são possivelmente reconhecidos por receptores TLR2, que são expressos em células do sistema imune, como macrófagos, monócitos, neutrófilos e DCs (IWASAKI & MEDZHITOV, 2010). As células dendríticas apresentam papel fundamental na apresentação de antígenos pois são capazes de ativar linfócitos T virgens e assim direcionar uma resposta celular e humoral timo-dependente, potencializando a produção de anticorpos IgG totais e seus isotipos, como observado no presente estudo. Esporos de bactérias do gênero *Bacillus*, principalmente *Bacillus subtilis,* têm longo histórico de uso como probióticos na alimentação humana e animal (CUTTING, 2011) e seu efeito adjuvante já foi abordado de forma semelhante em diversos trabalhos (APS et al., 2015; HUANG et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2012). Souza et al. (2014) demonstraram que a coadministração de esporos de *B. subtilis* em camundongos vacinados com uma vacina experimental contra HIV promoveu altos níveis de IgG totais. Esporos de *B. toyonensis* inoculados pela via subcutânea em camundongos que foram simultaneamente vacinados com a glicoproteína D recombinante de BoHV-5 foram capazes de induzir altos títulos de IgG total contra o antígeno (SANTOS et al., 2016).

A capacidade dos esporos de *B. toyonensis* de modular a resposta imune foi estudada através da análise do perfil dos níveis de IgG1, IgG2a e IgG2b. Os camundongos que receberam esporos na vacina responderam com níveis significativamente mais altos de IgG1 quando comparados aos grupos sem administração dos esporos, sugerindo uma resposta imune inicial do tipo Th2 (BRETSCHER, 2014). Além disso, foram verificados níveis significativos de IgG2a e IgG2b nos grupos que receberam esporos na formulação vacinal, o que sugere que ao longo dos dias analisados ocorreu uma modulação para a troca de isotipos e o desenvolvimento de uma resposta imune mista Th1/Th2 (SOUZA et al. 2014). A capacidade de esporos de bactérias do gênero *Bacillus* de modular uma resposta imune balanceada Th1/Th2 já foi abordada por Barnes et al. (2007), que verificaram a produção de IgG1 e IgG2a em camundongos vacinados com a toxina tetânica e coadministrados com esporos de *B. subtilis*. No presente trabalho, o fato dos níveis de isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b serem significativamente mais elevados nos grupos que receberam esporos de *B. toyonensis* na formulação vacinal, pode ser explicado devido ao possível reconhecimento da estrutura do esporo pelas células do sistema imune. A estrutura do esporo contém mais de 70 proteínas que estão dispostas na sua superfície (McKENNEY et al., 2010) e é reconhecida como um PAMP por receptores PRRs, que ativam APCs, principalmente as DCs, estimulando o desenvolvimento de uma resposta imune celular e humoral (LAMBRECHT et al., 2009; SOUZA et al., 2014).

Os níveis significativamente maiores de IgG2a e IgG2b nos grupos que receberam esporos na formulação vacinal pode sugerir o desenvolvimento de uma resposta antiviral contra o BoHV-5. Os anticorpos IgG apresentam papel importante na opsonização e neutralização de antígenos, como partículas virais, através de um mecanismo que envolve a interação da porção Fc (fragmento cristalizável) do anticorpo com receptores Fc, principalmente FcγRI, que são expressos em células dendríticas, macrófagos, neutrófilos e mastócitos (NIMMERJAHN & RAVETCH, 2005). A glicosilação da porção Fc de imunoglobulinas altera sua afinidade e ligação com os receptores Fc e é fundamental para determinar a função dos anticorpos (PINCETIC et al., 2014). Em camundongos, os isotipos IgG2a e IgG2b são considerados os mais pró-inflamatórios e se ligam com maior afinidade a receptores FcγRI do que IgG1, sendo fundamentais na ativação de mecanismos efetores em uma

resposta antiviral, como a opsonização e fagocitose do patógeno (MARKINE GORIAYANOFF & COUTELIER, 2002). Além disso, anticorpos IgG1, IgG2a e IgG2b têm alta afinidade com receptores FcγRIII (em humanos) e FcγRIV (em camundongos), que são expressos em células NK e são capazes de induzir ADCC (NIMMERJAHN & RAVETCH, 2008).

O alumen foi o adjuvante usado no presente trabalho, pois já é tradicionalmente utilizado em diversas vacinas humanas e animais (LEROUX-ROELS, 2010). O alumen é capaz de adsorver o antígeno em suas partículas e promover sua liberação de forma lenta para ser reconhecido pelas APCs, induzindo uma resposta imune Th2 por meio da ativação do inflamassoma NLRP3 (KOOL; FIERES; LAMBRECHT, 2012). No presente trabalho, verificou-se que os grupos que receberam os esporos associados a rgD e adsorvidos ao alumen apresentaram níveis significativos de IgG total quando comparados ao grupo rgD + alumen, sempre mantendo uma tendência de aumento dos níveis de IgG total durante os dias analisados. Esse perfil também foi observado nos isotipos IgG, pois os grupos rgD + esp. vivo + alumen e rgD + esp. inat + alumen apresentaram valores de razão IgG2a/IgG1 e IgG2b/IgG1 que aumentaram após a segunda dose da vacina e se mantiveram constantes ao longo dos dias analisados (Figura 3), sugerindo o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1. Esse perfil de resposta pode ocorrer devido a capacidade do alumen de apresentar efeito depósito no sítio de infecção, liberando lentamente e continuamente o antígeno às APCs e permitindo a geração de uma resposta específica contra o antígeno que dure por mais tempo (CAIN et al., 2013). Entretanto, o estudo deste efeito pelo alumen não foi avaliado no presente experimento. Além disso, foi observado que o alumen, quando adicionado na formulação vacinal do grupo que recebeu esporos inativados associados a rgD, potencializou a resposta deste grupo, apresentando níveis superiores ($p<0,05$) quando comparado ao grupo que recebeu somente os esporos inativados associados a rgD e semelhantes ($p>0,05$) quando comparado ao grupo que recebeu esporos vivos associados a rgD e adsorvidos ao alumen. Essa informação reflete a importância de utilização simultânea do alumen com os esporos inativados na formulação da vacina, que demonstraram ser igualmente eficientes em aumentar a resposta imune humoral dos animais como os esporos vivos, o que está de acordo com resultados encontrados anteriormente (SOUZA et al., 2014).

Uma das maneiras de avaliar como os esporos de *B. toyonensis* estimulam e/ou modulam a resposta imune é por meio do perfil da transcrição relativa de mRNA de citocinas. As citocinas são proteínas produzidas e secretadas por células do sistema imune que são fundamentais no direcionamento e regulação da resposta imune (GULATI et al., 2016). No presente trabalho, os esplenócitos dos camundongos do grupo rgD + esp. vivo, rgD + esp. vivo + alumen e rgD + esp. inat + alumen demonstraram níveis significativos de transcrição de mRNA de IFN-γ e IL-17 quando comparados ao grupo rgD + alumen. A maior produção de IL-17 se dá pelos linfócitos Th17, que são células altamente pró-inflamatórias e auxiliam na estimulação de linfócitos B e promovem a formação de centros germinativos, juntamente com a troca de isotipos para IgG1, IgG2a e IgG2b (MITSDOERFFER et al., 2010). Foi observado um aumento significativo nos níveis de transcrição de mRNA de IL-17 nos grupos rgD + esp. vivo + alumen e rgD + esp. inat + alumen quando comparado ao grupo rgD + alumen (Figura 4). Portanto, pode-se sugerir que parte do efeito adjuvante dos esporos na modulação do perfil de imunoglobulinas dos camundongos pode acontecer através da ação da citocina IL-17. A presença do IFN-γ caracteriza uma resposta do tipo Th1, que é fundamental em uma resposta imune contra vírus (FENSTERL & SEN, 2009). Os níveis significativos de transcrição relativa de IFN-γ apresentados pelos grupos rgD + esp. vivo e rgD + esp. inat + alumen quando comparado ao grupo rgD + alumen sugerem que o uso dos esporos na formulação vacinal pode ser capaz de induzir uma resposta favorável ao controle da infecção viral por BoHV-5. Resultados similares foram observados anteriormente em camundongos vacinados com uma vacina experimental contra BoHV-5 e suplementados com *B. toyonensis* (ROOS, et al. 2012; SANTOS et al., 2018) e em camundongos que foram vacinados com a proteína p24 de HIV e administrados com esporos de *B. subtilis* na formulação vacinal (SOUZA et al., 2014). Esses dados reforçam que os esporos têm a capacidade de potencializar a resposta imune vacinal e induzir uma resposta balanceada do tipo Th1/Th2.

No presente trabalho, o antígeno utilizado na formulação das vacinas foi a glicoproteína D recombinante de BoHV-5, que em estudos anteriores foi associada com adjuvantes oleosos e estimulou a produção de anticorpos neutralizantes em modelo murino (DUMMER et al., 2014) e também em bovinos (ARAÚJO, 2014). A resposta imune contra a infecção pelo BoHV-5 consiste inicialmente de uma resposta

inflamatória mediada por células do sistema imune inato, seguida do desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa com a ativação de linfócitos T e B e a produção de anticorpos neutralizantes responsáveis por inibir a replicação vírica e prevenir infecções secundárias (VARELA et al., 2010). No presente trabalho, foi constatada a presença de anticorpos neutralizantes contra BoHV-5 nos grupos rgD + esp. vivo + alumen e rgD + esp. inat + alumen, que foram os grupos que apresentaram maiores títulos de IgG total. A resposta imune humoral com produção de anticorpos neutralizantes contra o BoHV-5 é extremamente importante para o controle da infecção, gerando uma proteção efetiva contra o vírus e controlando futuras infecções (CAMPOS et al., 2009; KLASSE, 2014).

O presente estudo sugere que esporos de *B. toyonensis* apresentam propriedades adjuvantes e podem ser utilizados como potencial alternativa para aumentar a imunogenicidade de vacinas contra o BoHV-5. Os animais que receberam esporos junto a formulação vacinal apresentaram altos níveis de IgG e isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b que caracterizaram o desenvolvimento de uma resposta mista Th1/Th2, e os resultados sugerem que esse processo pode ter sido mediado por citocinas pró-inflamatórias, como IL-17 e IFN-γ. O uso de esporos inativados associados ao antígeno vacinal pode se destacar como uma alternativa considerada mais segura para uso em vacinas, pois o esporo não terá a capacidade de germinar no tecido (SOUZA et al., 2014) e de disseminar-se no ambiente de trabalho durante o processo de preparação das vacinas. Neste experimento, a associação da rgD aos esporos inativados adsorvidos ao alumen demonstrou resultados semelhantes quando comparado ao grupo que recebeu a rgD associada aos esporos vivos adsorvidos ao alumen. Ainda assim, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos de ação de esporos de *Bacillus toyonensis* como adjuvante de vacinas.

7 Considerações finais

- Esporos de *Bacillus toyonensis* apresentaram efeito adjuvante em camundongos vacinados com a glicoproteína D recombinante de herpesvírus bovino tipo 5;
- Esporos de *Bacillus toyonensis* foram capazes de modular a resposta dos níveis de IgG totais e dos isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b nos grupos em que foram administrados na formulação vacinal;
- Esporos de *Bacillus toyonensis* estimularam o desenvolvimento de uma resposta mista Th1/Th2;
- Esporos de *Bacillus toyonensis* quando associados a rgD e adsorvidos ao alumen induziram a transcrição de mRNA de citocinas IFN-γ e IL-17 em esplenócitos de camundongos;
- Esporos de *Bacillus toyonensis* quando associados a rgD e adsorvidos ao alumen estimularam a produção de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 5.

Referências

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 4th edition. New York: Garland Science, 2002.

ALOU, M. T. et al. *Bacillus rubiinfantis* sp. nov. strain mt2T, a new bacterial species isolated from human gut. **New Microbes and New Infections**. v. 8, p. 51–60, 2015.

APOSTÓLICO, J. S. et al. Adjuvants: Classification, *Modus Operandi*, and Licensing. **Journal of Immunology Research**. 2016

APS, L. R. et al. *Bacillus subtilis* spores as adjuvants for DNA vacines. **Vaccine**, v. 33, p. 2328-2334, 2015.

ARAUJO, I. L. **Resposta imune humoral em bovinos induzida pela glicoproteína D recombinante de herpesvírus bovino tipo 5**. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, 58f., 2014. Disponível em <http://repositorio.ufpel.edu.br/bitstream/123456789/1235/1/dissertacao_itaua_leston_araujo.pdf> Acesso em: 1 nov. 2018.

AWATE, S.; BABIUK, L. A.; MUTWIRI, G. Mechanism of action of adjuvants. **Frontiers in Immunology**. v. 4, n. 114, 2013.

BABIUK, L. A. et al. Protection of cattle from bovine herpesvirus type I (BHV-1) infection by immunization with individual viral glycoproteins. **Virology**. v. 159, p. 57–66, 1987.

BABIUK, L. A. et al. Immunology of 21 Bovine Herpesvirus 1 infection. **Veterinary Microbiology**. v. 53, p. 31-42, 1996.

BARNES, S. et al. *Bacillus subtilis* spores: A novel microparticle adjuvant which can instruct a balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen. **European Journal of Immunology**. v. 37, p. 1538-1547, 2007.

BHARDWAJ, N.; GNJATIC, S.; SAWHNEY, N. B. TLR AGONISTS: Are They Good Adjuvants?. **Cancer jornal**. v. 16, n. 4, p. 382-391, 2010.

BLACK, M. et al. Advances in the design and delivery of peptide subunit vacines with a focus on toll-like receptor agonists. **Expert Review of Vaccines**. v. 9, p. 157-173, 2010.

BRETSCHER, P. A. On the Mechanism Determining the Th1/Th2 Phenotype of an Immune Response, and its Pertinence to Strategies for the Prevention, and Treatment, of Certain Infectious Diseases. **Scandinavian Journal of Immunology**. v. 79, n. 6, p. 361-376, 2014.

BURAKOVA, Y. et al. Adjuvants for Animal Vaccines. **Viral Immunology**. v. 31, n. 1, 2018.

CAIN, D. W. et al. Disparate adjuvant properties among three formulations of “alum”. **Vaccine**. v. 31, n. 4, p. 653-660, 2013.

CAMPOS, F. S. et al. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**. v. 139, p. 67-73, 2009.

CARDONA, P. J. et al. Widespread bronchogenic dissemination makes DBA/2 mice more susceptible than C57BL/6 mice to experimental aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**. v. 71, p. 5845-5854.

CASCIO, K. E. et al. Encephalitis Induced by Bovine Herpesvirus 5 and Protection by Prior Vaccination or Infection with Bovine Herpesvirus 1. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 11, n. 2, p. 134-139, 1999.

CIABATTINI, A. et al. Oral priming of mice by recombinant spores of *Bacillus subtilis*. **Vaccine**. v. 22, p. 4139-4143, 2004.

CLARK, T. W. et al. Trial of 2009 influenza A (H1N1) monovalente MF59-adjuvanted vaccine. **The New England Journal of Medicine**. v. 361, p. 2424-2435, 2009.

CONKLIN, M. E. Mercurochrome as a bacteriological stain. **Journal of Bacteriology**. v. 27, n. 30, 1934.

CONTI, B. J.; SANTIAGO, K. B.; SFORCIN, J. M. Células dendríticas: mini-revisão. **Biosaúde**. v. 16, n. 1, 2014.

COPPOLA, M. M.; CONCEIÇÃO, F. R.; 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**. v. 16, n. 3, p. 213-219, 2005.

CURTSINGER, J. M.; MESCHER, M. F. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. **Current Opinion in Immunology**. v. 22, p. 333-340, 2010.

CUSI, M. G. Applications of influenza virosomes as a delivery system. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**. v. 2, n. 1, p. 1-7, 2006.

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

DE AVILA, L. F. D. C. et al. Modulation of IL-12 and IFN-γ by probiotic supplementation promotes against *Toxocara canis* infection in mice. **Parasite Immunology**. v. 38, p. 326-330, 2016.

DE GREGORIO, E.; CAPRONI, E.; ULMER, J. B. Vaccine Adjuvants: Mode of Action. **Frontiers in Immunology**. v. 4, n. 214, 2013.

DEL MÉDICO ZAJAC, M. P. et al. Review: Biology of bovine herpesvirus 5. **Journal of Virology**. v. 77, p. 10339- 10347, 2003.

DEL MÉDICO ZAJAC, M. P. et al. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. **Research in Veterinary Science**. v. 81, n. 3, p. 327-334, 2006.

DEN HAAN, J. M.; ARENS, R.; VAN ZELM, M. C. The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. **Immunology Letters**. v. 162, p. 103-112, 2014.

DUC, L. H. et al. Bacterial spores as Vaccine Vehicles. **Infection and Immunity**. v. 71, p. 2810-2818, 2003.

DUMMER, L. A. et al. Immune response in mice against recombinant bovine herpesvirus 5 glycoprotein D. **Vaccine**. v. 32, p. 2413-2419, 2014.

DUMMER, L. A.; LEITE, F. P. L.; VAN DRUNEN DEN HURK, S. Bovine herpesvírus glycoprotein D: a review of its structural characteristics and applications in vaccinology. **Veterinary Research**. v. 45, p. 111-123, 2014.

DUMMER, L. A. et al. Cloning and expression of a truncated form of envelope glycoprotein D of Bovine herpesvirus type 5 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Journal Virology Methods**. v. 161, p. 84-90, 2009.

ELSHAGHABEE, F. M. F. *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. **Frontiers in Microbiology**. v. 8, n. 1490, 2017.

FAN, Y. et al. T-cell factor-4 and MHC upregulation in pigs receiving a live attenuated classical swine fever virus (CSFV) vaccine strain with Interferongamma adjuvant. **Veterinary Journal**. v. 216, p. 148–156, 2016.

FENSTERL, V.; SEN, G. C. Interferons and viral infections. **BioFactors**. v. 35, n. 1, p. 14-20, 2009.

FISCHER, G. et al. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**. v. 25, p. 1250-1256, 2007.

FOERSTER, H. F.; FOSTER, J. W. Endotrophic calcium, strontium, and barium spores of Bacillus megaterium and Bacillus cereus. **Journal of Bacteriology**. v. 91, p. 1333–1345, 1996.

FRENCH, E. L. A. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. **Australian Veterinary Journal**. v. 38, p. 216-221, 1962.

FRITZE, D.; PUKALL, R. Reclassification of bioindicator strains Bacillus subtilis DSM 675 and Bacillus subtilis DSM 2277 as Bacillus atrophaeus. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 51, p. 35-37, 2001.

GABEV, E. et al. 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**. v. 84, p. 5583–5593, 2010.

GERAGHTY, R.; JOGGER, C.; SPEAR, P. Cellular expression of alphaherpesvirus gD interferes with entry of homologous and heterologous

alphaherpesviruses by blocking access to a shared gD receptor. **Virology**. v. 268, p. 147–158, 2000.

GIESKER, K.; HENSEL, M. Bacterial Vaccines. **Reference Module in Biomedical Science**, 2014.

GIL-TURNES, C.; CONCEIÇÃO, F. R.; GIL DE LOS SANTOS, J. R. *Bacillus cereus* var. *toyoi* improves feed efficiency and health in animals. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, v. 2, n. 1, p. 21-28, 2007.

GLENNY, A. T. et al. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. **The Journal of Pathology and Bacteriology**. v. 29, p. 31–40, 1926.

GREENWOOD, B. The contribution of vaccination to global health: past, present and future. Philosophical Transactions of the Royal Society B: **Biological Sciences**. v. 369, 2014.

GULATI, K. et al. Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview. **MOJ Immunology**. v. 4, 2016.

HAVLÍKOVÁ, M. et al. Adjuvant effect of *Bacillus firmus* in intranasal immunization of guinea pigs with inactivated type B infuenza vírus. **Folia Microbiologica**. v. 51, n. 2, p. 154-156, 2008.

HEEGAARD, P. M. et al. Adjuvants and delivery systems in veterinary vaccinology: current state and future developments. **Archives of Virology**. v. 156, p. 183-202, 2011.

HUANG, J. M. et al. Immunostimulatory activity of *Bacillus* spores. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 53, p. 195-203, 2008.

HUANG, J. M. et al. Mucosal delivery of antigens using adsorption to bacterial spores. **Vaccine**. v. 28, p. 1021-1030, 2010.

HUNG, L. H. et al. Adjuvant effects of chicken interleukin-18 in avian Newcastle disease vaccine. **Vaccine**. v. 28, n. 5, p. 1148-1155, 2010.

HYRONIMUS, B.; LE MARREC, C.; URDACI, M. C. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4. **Journal of Applied Microbiology**. v. 85, n. 1, p. 42-50, 1998.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nature Immunology**. v. 5, n. 10, 2004.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Regulation of adaptive immunity by the innate imune system. **Science**. v. 327, n. 5963, p. 291-295, 2010.

JIMÉNEZ, G. et al. Complete Genome Sequence of *Bacillus toyonensis* BCT-7112T, the Active Ingredient of the Feed Additive Preparation Toyocerin. **Genome Announcements**. v. 1, n. 6, 2013a.

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

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. **Immunity**. v. 34, 2011.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T.; Tolll-Like Receptor Signaling Pathways. **Frontiers in Immunology**. v. 5, n. 461, 2014.

KLASSE, P. J. Neutralization of Virus Infectivity by Antibodies: Old Problems in New Perspectives. **Advances in Biology**. p.1-24, 2014.

KOENDERMAN, L.; BUURMAN, W.; DAHA, M. R. The innate imune response. **Immunology Letters**. v. 162, p. 95-102, 2014.

KOOL, M.; FIERENS, K.; LAMBRECHT, B. N. Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant. **Journal of Medical Microbiology**. v. 61, p. 927-934, 2012.
KOTLA, S. et al. 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**. v. 193, p. 106–115, 2016.

KRIEG, A. M. Toll-free vaccines? **Nature Biotechnology**. v. 25, p. 303-305, 2007.

LAMBRECHT, B. N. et al. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. **Current Opinion in Immunology**. v. 21, p. 23-29, 2009.

LEROUX-ROELS, G. Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response. **Vaccine**. v. 28, p. 25-36, 2010.

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

MARKINE-GORIAYNOFF, D.; COUTELIER, J. P. 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**. v. 76, p. 432-435, 2002.

MARSEGLIA, G. L. et al. Efficacy of Bacillus clausii spores in the prevention of recurrent respiratory infections in children: a pilot study. **Therapeutics and Clinical Risk Management**. v. 3, n. 1, p. 13-17, 2007.

MBOW, M. L.; DE GREGORIO, E.; VALIANTE, N. M.; RAPPUOLI, R. New adjuvants for human vaccines. **Current Opinion Immunology**. v. 22, n. 3, p. 411-416, 2010.

McKENNEY, P. T.; DRIKS, A.; EICHENBERGER, P. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. **Nature Reviews Microbiology**. v. 11, n. 1, p. 33-44, 2013.

McKENNEY, P. T. et al. A distance-weighted interaction map reveals a previously uncharacterized layer of the *Bacillus subtilis* spore coat. **Current Biology**. v. 20, n. 10, p. 934-938, 2010.

MEADOR-PARTON, J.; POPHAM, D. L. Structural Analysis of *Bacillus subtilis* Spore Peptidoglycan during Sporulation. **Journal of Bacteriology**. v. 182, n. 16, p. 4491-4499, 2000.

MITSDOERFFER, M. et al. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***. v. 107, p. 14292–14297, 2010.

MIYAJI, E. N. et al. Trends in adjuvant development for vaccines: DAMPs and PAMPs as potential new adjuvants. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 44, p. 500-513, 2011.

MLCKOVÁ, P. et al. Enhanced systemic and mucosal antibody responses to a model protein antigen after intranasal and intratracheal immunisation using *Bacillus firmus* as an adjuvant. **Immunology Letters**. v. 77, n. 1, p. 39-45, 2001.

MONTOMOLI, E. et al., Current adjuvants and new perspectives in vaccine formulation. **Expert Review Vaccines**. v. 10, p. 1053–1061, 2011.

MOREFIELD, G. L. et al. Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells *in vitro*. **Vaccine**. v. 23, p. 1588-1595, 2003.

MURPHY, K. M.; REINER, S. L. The lineage decisions of helper T cells. **Nature Review Immunology**. v. 2, p. 933-944, 2002.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. Porto Alegre: ArtMed, 7ª edição, 2010.

NASCIMENTO, L. O. et al. *Bacillus atrophaeus* inactivated spores as a potential adjuvant for veterinary rabies vaccine. **Vaccine**. v. 30, p. 3351-3354, 2012.

NICHOLSON, W. J. et al. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology Molecular Biology Reviews**. v. 64, p. 548-572, 2000.

NIMMERJAHN, F.; RAVETCH, J. V. Divergent immunoglobulin G subclass activity through selective Fc receptor binding. **Science**. v. 310, p. 1510-1512, 2005.

NIMMERJAHN, F.; RAVETCH, J. V. Fcy receptors as regulators of immune responses. **Nature Reviews Immunology**. v. 8, n. 1, p. 34-47, 2008.
O'HAGAN, D. T.; GREGORIO, D. E. The path to a successful vaccine adjuvante: the long and winding road. **Drug Discovery Today**. v. 14, p. 541-551, 2009.

OSIPOVA, I. G. et al. Pre-clinical trials of new spore probiotics. **Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk**. p. 36-40, 2005.

OUYANG, W.; KOLLS, J. K.; ZHENG, Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. **Immunity**. v. 28, n. 4, p. 454-67, 2008.

PACCEZ, J. D. et al. Evaluation of different promoter sequences and antigen sorting signals on the immunogenicity of Bacillus subtilis vaccine vehicles. **Vaccine**. v. 25, p. 4671–4680, 2007.

PASHINE, A.; VALIANTE, N. M.; ULMER, J. B. Targeting the innate imune response with improved vaccine adjuvants. **Nature Medicine**. v. 11, n. 4, 2005.

PAUL, W. E.; ZHU, J. How are Th2-type imune response initiate and amplified? **Nature Reviews Immunology**. v. 10, n. 4, p. 225-235, 2010.

PENG, S. L. Signaling in B cells via Toll-like receptors. **Current Opinion in Immunology**. v. 17, p. 230-236, 2005.

PINCETIC, A. et al. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptative immunity. **Nature Immunology**. v. 15, n. 8, 2014.

PROKESOVÁ, L. Effect of *Bacillus firmus* and Other Sporulating Aerobic Microorganisms on Stimulation of Human Lymphocytes. A Comparative Study. **Folia Microbiological**, v. 39, n. 6, p. 501-504, 1994.

RAJPUT, Z. I. et al. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. **Journal of Zhejiang University Science B**. v. 8, n. 3, p. 153-161, 2007.

RAMBE, D. S. et al. Safety and Mechanism of Action of Licensed Vaccine **Adjuvants International Current Pharmaceutical Journal**. v. 4, n. 8, p. 420-431, 2015.

REED, S. G. et al. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends in Immunology**. v. 30, n. 1, p. 23–32, 2008.
RICCA, E.; CUTTING, S. M. Emerging Applications of Bacterial Spores in Nanobiotechnology. **Journal of Nanobiotechnology**. v. 1, n. 6, 2003.

RICCA, E. et al. Mucosal vaccine delivery by non-recombinant spores of *Bacillus subtilis.* **Microbial Cell Factories***.* v. 13, n. 115, 2014.

RISSI, D. R. et al. Meningoencefalite por Herpesvírus Bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 27, n. 7, p. 251-260, 2007.

ROIZMAN, B.; PELLETT, P. E. **Herpesviridae**. 6th ed., United States: Lippincott Williams & Wilkins publishers, p. 1802 – 1822, 2013.

ROOS, T. B. et al. The immune modulation of *Bacillus cereus* var. Toyoi in mice immunized with experimental inactivated Bovine Herpesvirus Type 5 vaccine. **Vaccine**. v. 30, p. 2173-2177, 2012.

ROOS, T. B. et al. Probiotics *Bacillus toyonensis* and *Saccharomyces boulardii* improve the vaccine immune response to Bovine herpesvirus type 5 in sheep. **Research in Veterinary Science**. v. 117, p. 260-265, 2018.

RUECKERT, C.; GUZMAN, C. A. Vaccines: from empirical development to rational design. **PLos Pathogens**. v. 8, n. 11, e1003001, 2012.

SANTOS, F. D. S. **Avaliação de *Bacillus toyonensis* como bioadjuvante em vacina recombinante**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, 58f., 2016. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/ppgveterinaria/files/2016/03/Francisco-Denis-Souza-Santos.pdf>
Acesso em: 1 nov. 2018.

SANTOS, F. D. S. et al. *Bacillus toyonensis* improves immune response in the mice vaccinated with recombinant antigen of bovine herpesvirus type 5. **Beneficial Microbes**. v. 9, n. 1, p. 133-142, 2018.

SCAN. Report of the Scientific Committee on Animal Nutrition on Product Toyocerin_ for Use as Feed Additive. European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General. (SCAN) **Scientific Committee on Animal Nutrition**, 2001.

SCHWENDENER, R. A. et al. Liposome-Based Vaccines. **Methods in Molecular Biology**. p. 163-175, 2010.

SETLOW, B. et al. Role of Dipicolinic Acid in Resistance and Stability of Spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-Protective /-Type Small Acid-Soluble Proteins. **Journal of Bacteriology**. v. 188, n. 11, p. 3740–3747, 2006.

SETLOW, P. Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of Bacillus species. **Annual Reviews Microbiology**. v. 49, p. 29-54, 1995.

SHAH, R. R.; HASSETT, K. J.; BRITO, L. A. Overview of Vaccine Adjuvants: Introduction, History, and Current Status. **Methods in Molecular Biology**. v. 1494, 2017.

SONG, M. et al. Killed *Bacillus subtilis* spores as a mucosal adjuvant for na H5N1 vaccine. **Vaccine**. v. 30, p. 3266-3277, 2012.

SOUZA, R. D. et al. *Bacillus subtilis* Spores as Vaccine Adjuvants: Further Insights into the Mechanisms of Action. **PLoS ONE**. v. 9, n. 1, 2014.

SPLITTER, G. A.; ESKRA, L.; ABRUZZINI, A. F. Cloned bovine cytolytic T cells recognize bovine herpes virus-1 in a genetically restricted, antigen-specific manner. **Immunology**. v. 63, p. 145–150, 1988.

TAN, I. S.; RAMAMURTHI, K. S. Spore formation in *Bacillus subtilis.* **Environmental Microbiology Reports**. v. 6 p. 212 – 225, 2014.

TAVARES, M. B. et al. *Bacillus subtilis* Endospores at High Purity and Recovery Yields: Optimization of Growth Conditions and Purification Method. **Current Microbiology**. v. 66, p. 279-285, 2013.

TAVASSOLI, S. et al. Investigation of spore coat display of *Bacillus subtilis* β-galactosidase for developing of whole cell biocatalyst. **Archives of Microbiology**. v. 195, p. 197-202, 2013.

TIKOO, S. K. et al. Molecular cloning, sequencing, and expression of functional bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIV in transfected bovine cells. **Journal of Virology**. v. 64, p. 5132–5142, 1990.

TRAAG, B. A. et al. Do mycobacteria produce endospores?. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 107, n. 2, p. 878-881, 2010.

TURVEY, S. E. et al. Chapter 2: Innate Immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 125, p. 24-32, 2010.

VARELA, A. P. M. Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) and its subtypes. **Veterinary Microbiology**. v. 142, p. 254-260, 2010.

VASUDEVAN, P. et al. Spore cortex formation in *Bacillus subtilis* is regulated by accumulation of peptidoglycan precursors under the control of sigma K. **Molecular Microbiology**. v. 65, p. 1582–1594, 2007.

VOGEL, F. S. et al. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, p. 4512-4520, 2003.

VOGEL, K. et al. Animal shed *Bacillus licheniformis* spores possess allergy-protective as well as inflammatory properties. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 122, n. 2, p. 307-312, 2008.

WAN, Y.; FLAVELL, R. A. How Diverse—CD4 Effector T Cells and their Functions. **Journal of Molecular Cell Biology**. v. 1, n. 1, p. 20-36, 2009.

WILLIAMS, L. D. et al. Literature review on the safety of Toyocerin®, a non-toxigenic and non-pathogenic Bacillus cereus var. toyoi preparation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 55, p. 236-246, 2009.

WIRTZ, R. Eine einfache Art der Sporenfarbung. **Zentralblatt fir Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten**. p. 727-72, 1908.

ZANVIT, P. et al. Adjuvant effect of *Bacillus firmus* on the expression of cytokines and toll-like receptors in mouse nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) after intranasal immunization with inactivated influenza virus type A. **Immunology Letters**. v. 134, p. 26-34, 2010.

ZIDEK, Z. et al. Stimulation of macrophages by *Bacillus firmus*: production of nitric oxide and cytokines. **International Journal of Immunopharmacology**. v. 20, p. 359-368, 1998.