

Suplementação com *Bacillus toyonensis* modula a produção de anticorpos em camundongos sensibilizados com antígenos de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*

Ana Paula Presley Oliveira Sampaio¹, Joelson Sousa Lima², Flavio da Silva³, Maiara Vasconcelos Monteiro³, Isis Abel Bezerra⁴, Fabio Pereira Leivas Leite⁵, Carina Martins de Moraes⁶, Talita Bandeira Roos⁷

1. Graduação em Tecnologia de Alimentos (Universidade do Estado do Pará, Brasil). Doutoranda em Saúde Animal (Universidade Federal do Pará, Brasil).
anapaulasampaio@hotmail.com <http://lattes.cnpq.br/2426260839895491> <http://orcid.org/0000-0002-7663-0848>
2. Graduação em Ciências Naturais/Biologia (Universidade do Estado do Pará, Brasil). Doutorando em Saúde Animal (Universidade Federal do Pará, Brasil).
joelsonbio@live.com <http://lattes.cnpq.br/9718556971858034> <http://orcid.org/0000-0002-0550-4318>
3. Graduação em Medicina Veterinária (Universidade Federal do Pará, Brasil).
flavioifpa@gmail.com <http://lattes.cnpq.br/2805785303102798> <http://orcid.org/0000-0002-0036-2533>
4. Graduação em Ciências Biológicas e Doutora em Ciências Veterinárias (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil). Professora da Universidade Federal do Pará, Brasil.
maiarafpa.2013@gmail.com <http://lattes.cnpq.br/8457619153563098> <http://orcid.org/0000-0002-3720-7457>
5. Graduação em Medicina Veterinária (Universidade Federal de Pelotas, Brasil). Doutor em Ciência Veterinária (University of Wisconsin, Estados Unidos). Professor da Universidade Federal de Pelotas, Brasil.
isabelbezerra@gmail.com <http://lattes.cnpq.br/3274919406647242> <http://orcid.org/0000-0003-0941-7286>
6. Graduação em Medicina Veterinária e Doutora em Biotecnologia (Universidade Federal de Pelotas, Brasil). Professora da Universidade Federal do Pará, Brasil.
fabio_leite@ufpel.edu.br <http://lattes.cnpq.br/0198257253890399> <http://orcid.org/0000-0002-7111-8159>
7. Graduação em Medicina Veterinária e Doutora em Veterinária (Universidade Federal de Pelotas, Brasil). Professora da Universidade Federal do Pará, Brasil.
carina_moraes@terra.com.br <http://lattes.cnpq.br/3908457799297670> <http://orcid.org/0000-0003-4630-1194>
8. Graduação em Medicina Veterinária e Doutora em Veterinária (Universidade Federal de Pelotas, Brasil). Professora da Universidade Federal do Pará, Brasil.
talitaroos@gmail.com <http://lattes.cnpq.br/7974179201535019> <http://orcid.org/0000-0003-4630-1194>

RESUMO

O estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação com o probiótico *Bacillus toyonensis* na cinética da produção de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a contra antígenos de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Foram utilizados 24 camundongos BALB/c, fêmeas, tendo em média 21 dias de idade, sensibilizados experimentalmente contra *L. (L.) infantum chagasi*, divididos em três grupos experimentais. O grupo A não recebeu suplementação, o grupo B foi suplementado de forma contínua até o dia 56 e no grupo C o probiótico foi administrado sete dias antes e sete dias após cada sensibilização, pelo mesmo período. O experimento foi conduzido até o dia 84. Foi utilizada a soroconversão para avaliação da resposta imune humoral. Durante a suplementação todos os animais apresentaram soroconversão de IgG total contra o antígeno utilizado, sem ser identificada diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos. Na análise de isotipagem, o grupo suplementado com probiótico no período contínuo apresentou resultados de soroconversão da razão IgG2a/IgG1 superior quando comparado ao grupo controle (1,8 vezes) e ao suplementado sete dias antes e sete dias após a suplementação (1,2 vezes) no dia 70, mantendo o seu título superior aos grupos em questão até o final do experimento (1,2 vezes no dia 84). Com base nesses resultados, pode-se observar maior habilidade do grupo suplementado continuamente modular favoravelmente a resposta imune humoral e manter a produção de anticorpos do isotipo IgG2a contra o antígeno em questão.

Palavras-chave: Leishmaniose canina, probiótico, resposta imunológica.

Bacillus toyonensis supplementation modulates and improves the antibody production in mice immunized with *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* antigens

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of supplementation with the probiotic *Bacillus toyonensis* on the production of IgG, IgG1 and IgG2a antibodies against *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* antigens. Twenty-four female albino BALB/c mice, 21 days old, were immunized experimentally against *L. (L.) infantum chagasi*, divided into three experimental groups. Group A received no supplementation, group B was continuously supplemented until day 56 and in group C the probiotic was administered seven days before and seven days after each immunization for the same period. The experiment was conducted until day 84. Seroconversion was used to evaluate the humoral immune response. During the supplementation, all the animals presented total IgG seroconversion against the antigen used, without statistical difference ($p > 0.05$) between the groups. In the isotype analysis, the group supplemented with probiotic in the continuous period presented seroconversion results of the upper IgG2a / IgG1 ray when compared to the control group (1.8 times) and to that supplemented seven days before and seven days after supplementation (1.2 times) on day 70, keeping their titre superior to the groups in question until the end of the experiment (1.2 times on day 84). Based on these results, it can be observed a greater ability of the supplemented group to continuously modulate favorably the humoral immune response and to maintain the production of IgG2a isotype antibodies against the antigen in question.

Keywords: Canine leishmaniasis; probiotic; immune response.

Introdução

Mesmo com o avanço no desenvolvimento e uso de imunógenos, a proteção dos animais pode ser comprometida com o uso de vacinas pouco imunogênicas ou por falhas no mecanismo e modulação de uma resposta imune adequada frente aos agentes infecciosos. Assim, faz-se necessário o uso de alternativas que auxiliem na proteção dos indivíduos (AGRESTI et al., 2012). Dessa maneira, os probióticos surgem como uma perspectiva para auxílio na melhoria das respostas imunológicas (GRANDIOSA et al., 2018).

Os probióticos são micro-organismos vivos que, ao serem ingeridos em quantidades adequadas, conferem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (FAO/OMS, 2001). Estudos têm demonstrado a ação imunomoduladora dos probióticos tanto em humanos quanto em animais

(VLASOVA et al., 2016; ZIMMERMANN; CURTIS, 2017). Os efeitos positivos do uso desses micro-organismos vão desde a ativação das células envolvidas na imunidade inata e/ou adquirida até a modulação da imunidade humoral ou celular (REN et al., 2015) podendo, inclusive, serem utilizados na potencialização de vacinas pouco imunogênicas (EZE et al., 2012; SAFARI et al., 2016; VLASOVA et al., 2016), proporcionando um meio acessível e promissor na prevenção e tratamento de doenças infecciosas.

Entre os micro-organismos que possuem ação probiótica *Bacillus toyonensis* sp. (JIMÉNEZ et al., 2013) tem apresentado resultados positivos na modulação do sistema imune de animais. Essa bactéria é uma estirpe de *Bacillus cereus* de ocorrência natural, não toxigênica e não patogênica, muito utilizada como ingrediente alimentar para animais

(WILLIAMS et al., 2009) devido a sua característica de formação de esporos, que confere maior sobrevivência durante o trânsito estomacal (HOA et al., 2000), elaboração, transporte e armazenamento das rações para animais (GILTURNES et al., 1999).

A leishmaniose visceral é uma antroponose de difícil controle no Brasil (MAIA et al., 2016), que se destaca por ser considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma enfermidade emergente, descontrolada e com altas taxas de infecção em áreas endêmicas. Um dos principais parâmetros para a sua prevenção está relacionado ao desenvolvimento de vacinas eficientes (JAIN; JAIN, 2015), mas atualmente a vacina disponível comercialmente aprovada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento não apresenta a eficácia esperada para o controle da doença a campo (GRIMALDI et al., 2017).

Para Gradoni (2015), as dificuldades no desenvolvimento de vacinas contra o parasita estão relacionadas a diversos fatores, entre eles a capacidade de induzir o hospedeiro em montar uma resposta imune protetora contra *Leishmania* spp. Na resposta humoral, a expressão das Imunoglobulinas G e suas subclasses é influenciada pela produção de citocinas (ROSTAMIAN et al., 2017), no qual uma resposta marcada com perfil Th1 induz a produção do isotipo IgG2a que está associado a proteção contra o parasita, apresentando lesões menores e menor carga parasitária. (CARNEIRO DE FREITAS, 2012; CANTOS-BARREDA et al., 2017; ELIKAE et al., 2019).

Estudos sugerem que *B. toyonensis* apresenta efeito na resposta proliferativa de linfócitos, além de modular a expressão dos níveis de anticorpos (ROOS et al., 2012) e de citocinas responsáveis pelo direcionamento de uma resposta intracelular com perfil Th1 (LI et al., 2007) eficaz contra o parasita, tornando a utilização deste probiótico promissora na modulação do sistema imunológico.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar se a suplementação com o probiótico *Bacillus toyonensis* apresenta efeito na resposta imune humoral de animais sensibilizados com antígenos de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*.

Material e métodos

A produção do probiótico foi realizada de acordo com o descrito previamente por Roos et al. (2012). A bactéria *B. toyonensis* foi cultivada e posteriormente, a solução contendo os esporos do micro-organismo foi incorporada à ração no título de 1×10^6 esporos por grama de alimento. O controle da pureza foi realizado em todas as etapas do processo, por meio de bacterioscopia com a coloração de Gram e da semeadura em ágar sangue.

Para obtenção do antígeno particulado, formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em final de fase logarítmica foram utilizadas. Inicialmente, a cultura foi submetida à centrifugação a $1540 \text{ g} / 4^\circ\text{C} / 10 \text{ min}$, seguida de duas lavagens em solução salina tamponada com fosfato (PBS, 0,1 M, pH 7,2). Para contagem total de parasitos, o sedimento foi ressuspenso em 10 mL de PBS (0,1 M, pH 7,2), diluído 1:50 da solução em formalina 4% e contados em câmara de Neubauer. Após, o material foi centrifugado e submetido a cinco sequências de congelamento e aquecimento a 37°C . Após a lise, o antígeno particulado foi ressuspenso em PBS (0,1 M, pH 7,2), de modo a se obter con-

centração final de 1 mg/mL de proteínas, dosado pelo método de Bradford (1967). A suspensão foi armazenada a -70°C até o uso.

Para a produção do imunógeno, foram utilizadas 100 µg do antígeno particulado previamente produzido, acrescido de 1000 µL de hidróxido de alumínio e 6000 µL de tampão fosfato. O experimento foi conduzido por 84 dias e a administração do imunógeno se deu por via subcutânea, no volume de 100 µL por animal, nos dias sete, seguido de três reforços nos dias 21, 42 e 70 do período experimental.

Foram utilizados 24 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, fêmeas, tendo em média 21 dias de idade, mantidos sob temperatura controlada de $22^\circ\text{C} (\pm 2^\circ\text{C})$ em ciclo de iluminação claro-escuro (12 horas), alimentados *ad libitum* com ração (sem adição de antibióticos e antifúngicos) e água. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), sob o protocolo n° 5758.

Os animais foram divididos em três grupos (Grupo A, B e C). O grupo A (controle) foi alimentado com ração comercial (sem adição de antibióticos e antifúngicos) e os grupos B e C foram alimentados com a mesma ração adicionada de 1×10^6 esporos de *B. toyonensis* por grama de alimento. O grupo B recebeu o probiótico continuamente desde o dia zero ao dia 56° e o grupo C apenas sete dias antes e sete dias após a administração do imunógeno nos dias 21 e 42 (desde o dia zero ao dia 28 e desde o dia 35 ao dia 49). A partir do dia 57° foi suspensa a administração de probiótico e os animais mantidos em experimentação por mais 28 [removida 1 frase], sendo o experimento conduzido até o dia 84. A cada sete dias os animais foram anestesiados com Quetamina + Xilazina por via peritoneal e amostras de sangue foram coletadas do plexo venoso retro orbitário com auxílio de pipeta Pasteur. As amostras colhidas foram centrifugadas por dez minutos a 3.000 rpm, para obtenção do soro. O soro obtido foi separado, identificado e armazenado a -4°C até o momento da análise dos níveis de anticorpos séricos.

Para avaliar os níveis de IgG total contra *L. (L.) infantum chagasi* nos soros, foi empregado o Ensaio da Imunoabsorbância Ligado à Enzima (ELISA) indireto. As placas de poliestireno com 96 cavidades (Nunc PolySorp®) foram sensibilizadas com 100 µL do antígeno particulado, na concentração inicial de 1 mg/mL, diluído (1:100) em Tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6), e incubadas durante a noite, à 4°C . Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com solução de Tampão Fosfato (pH 7,6) contendo 0,5% de Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com 100 µL de solução de PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado, por 30 minutos, a temperatura ambiente, sendo as placas posteriormente lavadas novamente por três vezes com PBS-T. Após o bloqueio, foram adicionados em duplicata 100 µL de cada soro diluídos em PBS-T (1:100) [removida 1 palavra], incubando-se a placa por 60 minutos a 37°C . Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e adicionados 100 µL do conjugado de imunoglobulinas IgG anti-camundongo, ligadas a peroxidase (Dako®), diluído em PBS-T (1:5000). As placas foram então incubadas por 90 minutos a 37°C e após esse período foram lavadas cinco vezes com PBS-T e 100 µL de substrato/cromógeno (SIGMAFAST™ OPD) foi adicionado em cada poço, reagindo sob proteção da luz por 15 minutos à temperatura ambiente.

Para a detecção das IgG1 e IgG2a foi utilizado um *kit* de reagentes ISO2-1KT de anticorpos monoclonais de camundongo (Sigma-Aldrich™). A etapa de sensibilização e bloqueio foi realizada de forma idêntica a descrição da técnica anterior, seguido da adição em duplicata de 100 µL do *pool* dos soros de cada coleta diluídos (1:100) em PBS-T e incubados a 37°C durante 60 min., seguido de lavagens com PBS-T. Em seguida, 100 µL de anticorpos monoclonais anti-IgG de camundongo (anti-IgG1 e anti-IgG2a) produzidos em cabra diluídos na proporção 1:2000 em PBS-T foram adicionados e incubados a 37°C por 30 min. Depois disso, procedeu-se a lavagem e adicionou-se 100 µL de imunoglobulina anti-cabra conjugada com peroxidase (1:4000), novamente incubadas por 15 min a 37°C. Após esse período, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T e 100 µL de substrato/cromógeno (SIGMAFAST™OPD) foi adicionado em cada poço, reagindo sob proteção da luz por 15 minutos à temperatura ambiente.

Nas duas técnicas descritas, as placas foram imediatamente submetidas a leitura de absorbância em leitor de microplacas (Eon Biotek, Programa GEN 5) com filtro de 450nm para IgG total e IgG2a/IgG1. Cada placa continha dois controles negativos (sem adição de soro) e dois controles positivos (soro de animais sensibilizados contra *L. infantum*) que foram utilizados para o controle entre placas. Os resultados foram expressos em soroconversão.

Os dados de IgG Total foram submetidos às análises estatísticas descritiva e analítica, realizadas com auxílio dos softwares Microsoft Excel e SPSS v. 20. Inicialmente, a normalidade dos dados foi verificada com o teste Shapiro-Wilk. Quando os dados não apresentavam distribuição normal foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, enquanto para os dados paramétricos foi ANOVA. Todos os testes foram aplicados ao nível de significância de cinco por cento e intervalo de confiança de 95% para identificação de diferenças significativas entre os grupos. Os dados de isotipagem foram submetidos a análise descritiva.

Resultados e discussão

Diferentes abordagens na busca por resultados eficientes no desenvolvimento de vacinas têm sido utilizadas para o controle de doenças infecciosas. Nesse contexto, este estudo avaliou se a suplementação com probiótico a base de *B. toyonensis* apresenta efeito na modulação da resposta imune humoral de camundongos, podendo ser considerado uma alternativa para melhoria da resposta imune frente a antígenos de *L. (L.) infantum chagasi*.

Na análise sorológica de IgG total observou-se que os antígenos induziram soroconversão em todos os animais sensibilizados, porém, não foram identificadas diferenças na produção de IgG entre os grupos testados ($p > 0,05$) durante o período experimental. A suplementação com o probiótico em questão não elevou o título de IgG total anti-*Leishmania* em comparação com o grupo controle. Em modelo murino, Miles et al. (2005) relataram que altos títulos de IgG não fornecem proteção contra *Leishmania* spp. mas sim podem contribuir para a progressão da doença, pois o aumento de IgG total está relacionado ao aumento na produção de IL-4 e IL-10, e essas citocinas são características de resposta não protetora mediada por Th2, indesejável contra o parasita em estudo (ANDERSON et al., 2005).

O perfil de citocinas produzidas frente ao antígeno está relacionado com a produção de subclasses de imunoglobulinas e pode ser um evidente marcador de suscetibilidade para a doença (FERNANDES-PEREZ et al., 2003). Em camundongos, a secreção de IL-4 promove a produção de IgG1, enquanto IFN- γ eleva a produção de IgG2a, citocinas essas relacionadas com suscetibilidade ou resistência a *Leishmania* sp, respectivamente. A produção de IgG2a, que participa no processo de resistência à infecção, pode estar associada a uma resposta do tipo Th1, enquanto o subtipo IgG1 estaria associada a uma resposta Th2, resultando no aumento da sobrevivência do parasito e na exacerbação das lesões (ROSTAMIAN et al., 2015).

Na figura 1 observa-se os dados de soroconversão de IgG1. A partir do dia 28 os animais do grupo controle apresentaram títulos de imunoglobulinas IgG1 maior do que os grupos suplementados, o que continuou até o final do estudo. No dia 84, o grupo controle apresentou soroconversão de 2,23, o grupo contínuo de 1,23 e o grupo suplementado antes e após as vacinações 1,54.

Esse resultado sugere que a suplementação com o probiótico levou a uma resposta imune humoral com níveis menores de do isotipo IgG1, que está associado a uma resposta imune celular Th2 (desfavorável para proteção contra o parasita em questão) mostrando que o probiótico, quando administrado é capaz de modular a soroconversão a favor de uma resposta Th1, mantendo os níveis de IgG2a, que é interessante na proteção contra o parasito em estudo.

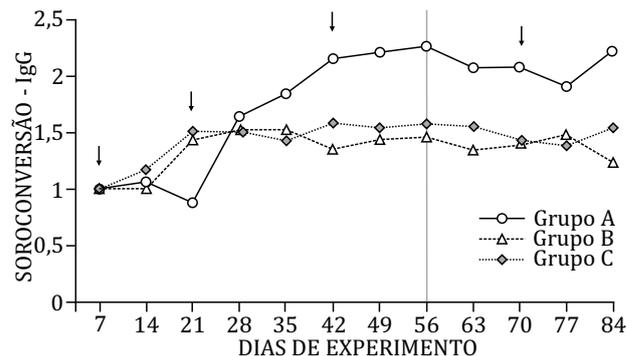


Figura 1. Soroconversão de IgG1 entre os grupos controle (grupo A) e suplementados com probiótico a base de *Bacillus toyonensis* continuamente (grupo B) e suplementados sete dias antes e após cada vacinação (grupo C). As setas indicam os dias das vacinações e a linha a suspensão do probiótico no dia 56. / **Figure 1.** IgG1 seroconversion between control groups (group A) and supplemented with *Bacillus toyonensis*-based probiotic continuously (group B) and supplemented seven days before and after each vaccination (group C). Arrows indicate days of vaccinations and line probiotic suspension on day 56.

Em uma pesquisa realizada com porcas prenhes foi observado que o probiótico *B. toyonensis* altera a resposta proliferativa de linfócitos e afeta as proporções de populações de células do sistema imunológico (SCHIERACK et al., 2009), concluindo que o micro-organismo em questão oferece uma perspectiva sobre a sua utilização na estimulação da resposta humoral e celular.

Os dados de isotipagem mostram variações na razão de IgG2a/IgG1 entre os animais suplementados e não suplementados (Fig. 2). A partir do dia 42, foi possível observar a modulação do *B. toyonensis* na razão de IgG2a/IgG1. No grupo com suplementação contínua esta proporção foi de 0,86, no suplementado sete dias antes e após as vacinações foi 0,7, enquanto no grupo controle foi de 0,5. Estes dados sugerem que o probiótico estimulou uma maior proporção na razão IgG2a/IgG1 em comparação com o grupo não suplementando.

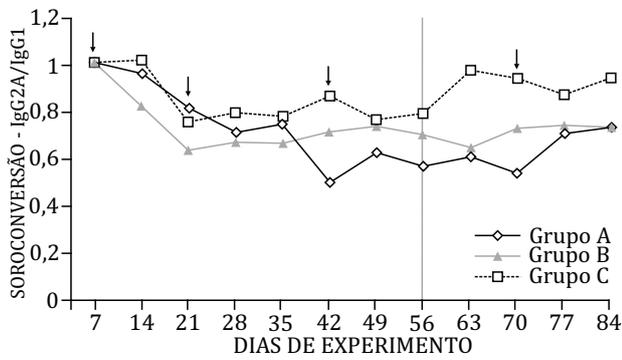


Figura 2. Razão das soroconversões de IgG2a/IgG1 entre os grupos controle (grupo A) e suplementados com probiótico a base de *Bacillus toyonensis* continuamente (grupo B) e suplementados sete dias antes e após cada vacinação (grupo C). As setas indicam os dias das vacinações e a linha a suspensão do probiótico no dia 56. / **Figure 2.** Ratio of IgG2a / IgG1 seroconversions between control groups (group A) and supplemented with *Bacillus toyonensis* continuously (group B) and supplemented seven days before and after each vaccination (group C). Arrows indicate days of vaccinations and line probiotic suspension on day 56.

No período onde a suplementação foi suspensa observou-se a capacidade do *B. toyonensis* manter seu efeito modulador mesmo após a parada da administração do probiótico. No dia 70, o grupo sem suplementação apresentou uma proporção de 0,54 enquanto o grupo suplementado continuamente e o grupo suplementado antes e após cada vacinação apresentou proporções maiores, as quais foram 0,93 e 0,72, respectivamente. Após esse período, pode-se observar maior capacidade de modulação no grupo contínuo, este manteve a razão do isotipo IgG2a, 1,2 vezes superior aos demais grupos.

Da mesma forma Roos et al. (2012) em trabalho utilizando o mesmo probiótico em animais imunizados contra *BOHV-5* observaram que mesmo após a suspensão da suplementação do *B. toyonensis* os animais suplementados responderam à vacina com aumento na razão de imunoglobulinas IgG2a/ IgG1 quando comparado ao grupo não suplementado. Por esta razão, sugerimos que o probiótico possa ter estimulado a produção de plasmócitos e células B de memória a responder mais rapidamente as exposições e dentro de um perfil de imunoglobulinas desejado para uma resposta eficaz para o agente em questão.

No mesmo modelo experimental, Roos et al. (2018) examinaram por 48 dias o uso do probiótico *Saccharomyces boulardii* como adjuvante para melhorar a eficácia da vacina contra *BOHV-5* e consideraram que os animais suplementados apresentaram aumento na razão em favor de IgG2a/Th1 nas proporções de 0,51 para controle e 0,87 para o grupo suplementado, mantendo essa proporção durante o experimento.

Os resultados aqui apresentados estão de acordo com resultados publicados anteriormente utilizando o mesmo probiótico, revelando que a suplementação tem capacidade de modular favoravelmente a resposta humoral frente diferentes antígenos, como por exemplo em ovinos vacinados contra *E. coli* e *Herpes Vírus bovino tipo 5* (ROOS et al., 2010), leitões vacinados contra H3N2 *Influenza* e *Mycoplasma* (SCHIERACK et al., 2007), camundongos vacinados contra *E. coli* e Parvovírus (COPPOLA et al., 2005), apresentando sempre médias de soroconversão superiores nos grupos suplementados.

O uso dos probióticos em geral fornecem um meio acessível para a prevenção e tratamento de doenças, porém exige seleção cuidadosa antes da sua aplicação já que diferentes cepas diferem suas funções imunomoduladoras (ASHRAF; SHAH, 2014). Nosso trabalho, evidência o poten-

cial de uso do probiótico *Bacillus toyonensis* como estratégia viável para melhora da resposta imunológica em camundongos vacinados contra antígenos que necessitem de uma resposta mediada do tipo Th1.

Conclusão

Os resultados destacam o potencial uso *B. toyonensis* na estimulação da produção e manutenção de um perfil de anticorpos favoráveis contra *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, abrindo perspectivas para estudos posteriores utilizando esse micro-organismo.

Agradecimentos

Agradecemos a CAPES e CNPq pelo apoio financeiro e concessão de bolsas.

Referências Bibliográficas

- ANDERSON, C. F.; MENDES, S.; SACKS, D.L. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *The Journal of Immunology*, v. 174, p. 2934-2941, 2005.
- ASHRAF, R.; SHAH, N. P. Immune System Stimulation by Probiotic Microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 54, p. 938, 2014.
- BLOM, A. G.; HILGERS, L. A. The sucrose fatty acid sulphate esters as novel vaccine adjuvants: effect of the chemical composition. *Vaccine*, v. 23, n. 6, p. 743-754, 2005.
- BRADFORD, M. M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CARNEIRO DE FREITAS, J. C.; LOPES-NETO, B. E.; AMARAL DE ABREU, C. R.; COURA-VITAL, W.; BRAGA, S.L.; REIS, A. B.; SOUSA, D. C. Profile of anti-*Leishmania* antibodies related to clinical picture in canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*, v. 93, p. 705-709, 2012.
- CANTOS-BARREDA, A.; ESCRIBANO, D.; BERNAL, L. J.; CERÓN, J. J.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. New wide dynamic range assays for quantification of anti-*Leishmania* IgG2 and IgA antibodies in canine serum. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 189, p. 11-16, 2017b.
- CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Normativas para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, ed.2, 2015.
- COPPOLA, M. de M.; TURNES, C.G. Probióticos e resposta imune. *Ciência Rural*, v. 34, p. 1297-1303, 2004.
- COPPOLA, M. M.; CONCEIÇÃO, F. R.; GIL-TURNES, C. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *Toyo* on the humoral and cellular response of mice to vaccines. *Food and Agricultural Immunology*, v. 16, p. 213-219, 2005.
- ELIKAEE, S.; MOHEBALI, M.; REZAEI, S.; ESLAMI, H.; KHAMESIPOUR, A.; KESHAVARZ, H.; ESHARAGHIAN, M. R. *Leishmania major* p27 gene knockout as a novel live attenuated vaccine candidate: Protective immunity and efficacy evaluation against cutaneous and visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Vaccine*, v. 37, n. 24, p. 3221-3228, 2019.
- EZE, J. I.; ORAJAKA, L. J. E.; OKONKWO, N. C.; EZEH, I. O.; EZEMA, C.; ANOSA, G. N. Effect of probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation on immune response in *Trypanosoma brucei* infected rats. *Experimental Parasitology*, v. 132, p. 434-439, 2012.
- FERNÁNDEZ-PÉREZ, F. J.; GÓMEZ-MUÑO, M. T.; MÉNDEZ, S.; ALIND, J. M. *Leishmania*-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. *Acta Tropica*, v. 86, p. 83-91, 2003.
- GIL-TURNES, C.; SANTOS, A. F.; CRUZ, F. W.; MONTEIRO, A. V. Properties of the *Bacillus cereus* strain used in probiotic CenBio. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 30, n. 1, p. 11-14, 1999.
- GRADONI, L. Canine *Leishmania* vaccines: Still a long way to go. *Veterinary Parasitology*, v. 208, p. 94-100, 2015.
- GRANDIOSA, R.; MERIEN, F.; YOUNG, T.; NGUYEN, T. V.; GUTIERREZ, N.; KITUNDU, E.; ALFARO, A. C. Multi-strain probiotics enhance immune responsiveness and alters metabolic profiles in the New Zealand black-footed albatross (*Haliootis iris*). *Fish & Shellfish Immunology*, v. 82, p. 330-338, 2018.
- GRIMALDI, G. R.; TEVA, A.; DOS-SANTOS, C. B.; SANTOS, F. N.; PINTO, I. S.; FUZ, B.; LEITE, G. R.; FALQUETO, A. Field trial of efficacy of the Leish-tec™ vaccine against canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in an endemic area with high transmission rates. *Plos One*, v. 12, n. 9, 2017.
- HOA, N. T.; BACCIGALUPI, L.; HUXHAM, A.; SMERTENKI, A.; VAN, P. H.; AMMENDOLA, S.; RICCA, E.; CUTTING, S. M. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacteriophage of gastrointestinal disorders. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 12, p. 5241-5247, 2000.
- JAIN, K.; JAIN, N. K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. *Journal of Immunological Methods*, v. 422, p. 1-12, 2015.
- JIMÉNEZ, G.; URDIANB, M.; CIFUENTES, A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; BLANCHC, A. R.; TAMAMES, J.; KÄMPFER, P.; KOLSTØF, A. B.; MARTÍNEZ, J. F.; CODONER, F. M.; ROSSELLÓ-MORA, R. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 36, n. 6, p. 383-391, 2013.
- LI, H.; NOOKALA, S.; RE, F. Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1 β and IL-18 release. *The Journal of Immunology*, v. 178, p. 271-276, 2007.
- MAIA, Z.; VIANA, V.; MUNIZ, E.; GONÇALVES, L. O.; MENDES, C. M. C.; MEHTA, S. R.; BADARO, R. Risk Factors Associated with Human Visceral Leishmaniasis in an Urban Area of Bahia, Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 16, p. 6, 2016.
- MILES, S. A.; CONRAD, S. M.; ALVES, R. G.; JERONIMO, S. M.; MOSSER, D. M. A role for IgG immune complexes during the intracellular pathogen *Leishmania*. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 201, n. 5, p. 747-754, 2005.
- REN, D.; CHANG, L.; YANQING Q.; RONGLAN, Y.; SHOUWEN, D.; HONGFENG, L.; YANFANG, Z.; CUIYAN, W.; FENGJUN, R.; NINGYI, J. Evaluation of immunomodulatory activity of two potential probiotic *Lactobacillus* strains by in vivo tests. *Anaerobe*, v. 35, p. 22-27, 2015.
- ROOS, T. B.; DE LARA, A. P. S. S.; DUMMER, L. A.; FISCHER, G.; LEITE, F. P. L. The immune modulation of *Bacillus cereus* var. *Toyo* in mice immunized with experimental inactivated Bovine Herpesvirus Type 5 vaccine. *Vaccine*, v. 30, n. 12, p. 2173-2177, 2012.
- ROOS, T. B.; TABELLAO, V. C.; DÜMMER, L. A.; SCHWEGLER, E.; GOULART, M. A.; MOURA, S. V.; CORRÊA, M. N.; LEITE, F. P. L.; GIL-TURNES, C. Effect of *Bacillus cereus* var. *Toyo* and *Saccharomyces boulardii* on the immune response of sheep to vaccines. *Food and Agricultural Immunology*, v. 21, n. 2, p. 113-118, 2010.
- ROOS, T. B.; ÁVILA, L. F. C.; STURBELLE, R. T.; LEITE, F. L. L.; FISCHER, G.; LEITE, F. P. L. *Saccharomyces boulardii* modulates and improves the immune response to Bovine Herpesvirus type 5 Vaccine. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 70, n. 2, p. 375-381, 2018.
- ROSTAMIAN, M.; SOHRABJ, S.; KAVOSIFARD, H.; NIKNAM, H. Lower levels of IgG1 in comparison with IgG2a are associated with protective immunity against *Leishmania tropica* infection in BALB/c mice. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 50, n. 2, p. 160-166, 2015.
- SAPARI, R.; ADEL, M.; LAZADO, C. C.; CAIPANG, C. M. A.; DADAR, M. Host-derived probiotics *Enterococcus casseliflavus* improves resistance against *Streptococcus iniae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) via immunomodulation. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 52, p. 198-205, 2016.
- SCHIERACK, P.; FILTRO, M.; SCHAREK, L.; TOELKE, C.; TARAS, D.; TENDIN, K.; HAVERSON, K.; LUBKEBECKER, A.; WIELER, L. H. Effects of *Bacillus cereus* var. *Toyo* on immune parameters of pregnant. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 127, p. 26-37, 2009.
- SCHIERACK, P.; LOTHAR WIELER, H.; TARAS, D.; HERWING, V.; TACHU, B.; HLINAK, A.; FG SCHMIDT, M.; SCHAREK, L. *Bacillus cereus* var. *Toyo* enhanced systemic immune response in piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 118, p. 1-11, 2007.
- SINGH, M.; OHAGAN, D.T. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharmaceutical Research*, v. 19, p. 715-728, 2002.
- VLASOVA, N. A.; KANDASAMY, S.; CHATTHA, K. S.; RAJASHEKARA, G.; SAIF, L. J. Comparison of probiotic lactobacilli and bifidobacteria effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 172, p. 72-84, 2016.
- WILLIAMS, L.; BURDOCK, G.; JIMÉNEZ, G.; CASTILLO, M. Literature review on the safety of Toyocerin, a non-toxicogenic and non-pathogenic *Bacillus cereus* var. *toyo* preparation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 55, p. 236-246, 2009.
- ZIMMERMANN, P.; CURTIS, N. The influence of probiotics on vaccine responses-A systematic review. *Vaccine*, v. 35, n. 2, p. 207-213, 2017.