

ESPOROS DE *Bacillus toyonensis* COMO ADJUVANTE DE VACINA RECOMBINANTE EM CAMUNDONGOS

LUCAS REICHERT MAUBRIGADES¹; FRANCISCO DENIS SOUZA SANTOS²;
VITÓRIA SEQUEIRA GONÇALVES³; RODRIGO CASQUERO CUNHA⁴; FÁBIO
PEREIRA LEIVAS LEITE⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – lucasmaub@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – denis.santos195@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – vitoriasgon@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – rodrigocunha_vet@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – fabio@leivasleite.com.br

1. INTRODUÇÃO

Adjuvantes são agentes que estimulam o sistema imune, capazes de aumentar a imunogenicidade de um antígeno coadministrado ou modular a resposta imunológica naturalmente induzida contra esse antígeno (KRIEG, 2007). Tais compostos representam um componente importante de vacinas convencionais e de subunidade (LAMBRECHT et al., 2009). Vacinas de subunidade baseadas em antígenos recombinantes são menos reatogênicas, porém, muitas vezes, pouco imunogênicas, sendo geralmente associadas com adjuvantes (MBOW et al., 2010).

Bacillus toyonensis é uma bactéria Gram-positiva capaz de esporular, que é comumente utilizada como probiótico na alimentação humana e animal (WILLIAMS et al., 2009). Esporos de *B. toyonensis* utilizados como probióticos modularam a resposta imune e melhoraram a eficácia de uma vacina recombinante em camundongos (SANTOS et al., 2018).

Esporos são estruturas proteicas extremamente resistentes produzidas por algumas bactérias em resposta a condições ambientais adversas (HUANG et al., 2008). Além disso, esporos de outras espécies do gênero *Bacillus*, como *B. subtilis*, possuem propriedades imunomoduladoras pois promovem um aumento na resposta de anticorpos contra antígenos solúveis coadministrados a ele, sendo capazes de aprimorar a eficácia de vacinas recombinantes (DE SOUZA et al., 2014, HUANG, et al., 2010).

O Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é o agente da meningoencefalite herpética dos bovinos. Vacinas de subunidades contra os herpesvírus são desenvolvidas baseadas nas principais glicoproteínas do envelope viral que são responsáveis pela ligação e penetração do vírus na célula e também medeiam as respostas imunológicas do hospedeiro à infecção (BABIUK et al., 1996). A glicoproteína D (gD) é essencial para penetração do vírus nas células hospedeiras (GERAGHTY et al., 2000). Devido a baixa imunogenicidade dos antígenos recombinantes, se faz necessário o uso de adjuvantes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito adjuvante de esporos de *Bacillus toyonensis* associados a gD recombinante (rgD) de BoHV-5 em camundongos.

2. METODOLOGIA

Para a produção dos esporos, *B. toyonensis* foi semeado em meio BHI ágar (Brain Heart Infusion, Difco) e incubado por 24 horas à temperatura de 37 °C. Colônias isoladas foram inoculadas em frascos de 125mL contendo 10mL de meio LB (Luria-Bertani) incubados por 18 horas a 37 °C com agitação constante de 200rpm. Esses cultivos foram inoculados em 90mL de meio F (FOERSTER &

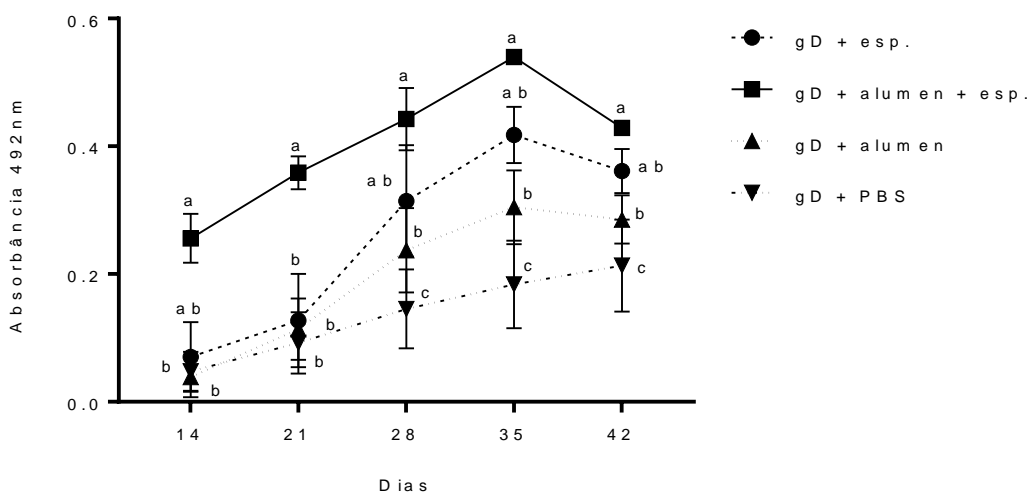
FOSTER, 1966) e incubados em agitador orbital por 96 horas a 37 °C. Os cultivos foram centrifugados a 10.000 x g durante 10 minutos e concentrados em um volume final de 20mL. Após, foi mantido em banho-maria a 68 °C por 3 horas para eliminação de células vegetativas. Em seguida, foi realizada a purificação dos esporos de acordo com o método descrito por Tavares et al. (2013). A avaliação da frequência de esporulação foi realizada ao final do processo por meio de coloração de Wirtz-Conklin.

Foram utilizados 42 camundongos Swiss, fêmeas, de 28 dias de idade, divididos em quatro grupos experimentais denominados: gD + esp., gD + esp. + alumen, gD + alumen e gD + PBS. O grupo gD + esp. recebeu 2×10^9 UFC de esporos associados com 40µg de rgD. O grupo gD + esp. + alumen recebeu 2×10^9 UFC de esporos associados com 40µg de rgD adsorvidos em 10% de hidróxido de alumínio (alumen). O grupo gD + alumen recebeu 40µg de rgD adsorvidos em 10% de alumen. O grupo gD + PBS recebeu 40µg de rgD em solução salina fosfatada pH 7,4 (PBS). Todos os animais sofreram inoculação/injeção nos dias 0 e 21 do experimento por via subcutânea com um volume de 0,2mL da respectiva formulação vacinal. Amostras de sangue foram coletadas nos dias 0,14, 21, 28, 35 e 42 do experimento no Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas e o soro separado e armazenado a -20 °C até o momento de realização das análises.

A presença de anticorpos foi avaliada por ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto, segundo Dummer et al. (2014), para IgG total e para os isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. A análise estatística foi realizada utilizando análise de variância (two-way ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, com o auxílio do software GraphPadPrism 11 v7.0d (GraphPad Software, CA, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais responderam a vacina com aumento dos níveis de anticorpos totais (IgG) (Figura 1). Os camundongos vacinados com as vacinas que continham os esporos de *B. toyonensis* (gD + esp. e gD + esp. + alumen) apresentaram maiores níveis de IgG quando comparados aos grupos que não possuía esporos associados ao antígeno vacinal (gD + alumen e gD + PBS). Durante todos os dias avaliados, o grupo gD + esp. + alumen apresentou níveis de IgG superiores ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos gD + alumen e gD + PBS. Estudos já foram realizados anteriormente, mostrando as propriedades imunomoduladoras de esporos de *Bacillus subtilis* associados a um antígeno



recombinante viral, sugerindo a possibilidade de utilização desses compostos como adjuvante vacinal. (DE SOUZA et al., 2014)

Figura 1. Dinâmica dos níveis de IgG totais em camundongos vacinados com a rgD de BoHV-5 associada com esporos de *B. toyonensis*. 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, dentro do dia.

Nos dias 28, 35 e 42 do experimento foi observado o perfil de isotipos de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 (Figura 2). Os camundongos dos grupos gD + esp. e gD + esp. + alumen apresentaram níveis de IgG2a, IgG2b e IgG3 superiores ($p<0,05$) quando comparados ao grupo gD + alumen avaliados. Detectou-se níveis semelhantes de IgG1 ($p>0,05$) entre os grupos, caracterizando uma resposta inicial do tipo Th2 (DUMMER et al., 2014). É importante, porém, observar a presença de altos níveis de IgG2a, IgG2b e IgG3 nos grupos vacinados com rgD associada aos esporos, sugerindo uma mudança no perfil da resposta, uma vez que esses isotipos são característicos de resposta do tipo Th1. Essa observação sugere o desenvolvimento de uma resposta balanceada Th1/Th2. Além disso, os isotipos IgG2a e IgG2b constituem uma classe de imunoglobulinas com papel importante na resposta pró-inflamatória de roedores, com destaque para IgG2a, que é responsável pela ativação de mecanismos efetores durante uma resposta imune induzida por vírus, como a ativação do sistema complemento. (NIMMERJAHN, F. & RAVETCH, J. V., 2005).

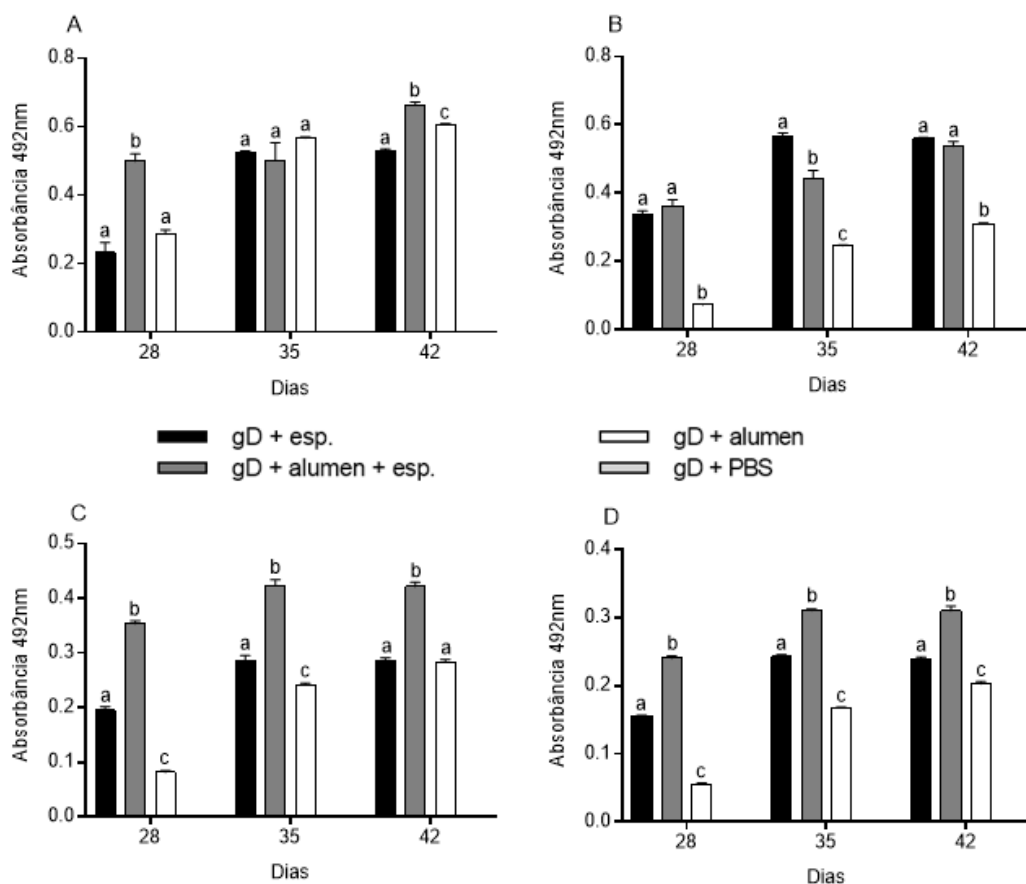


Figura 2. Perfil de isotipos de imunoglobulinas em camundongos vacinados com rgD de BoHV-5 associado com esporos de *B. toyonensis*. (A) Níveis de IgG1. (B) Níveis de IgG2a. (C) Níveis de IgG2b. (D) Níveis de IgG3. As letras iguais

significam que não há diferença estatística ($p > 0,05$) e letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais dentro do dia.

4. CONCLUSÕES

O presente estudo sugere que esporos de *B. toyonensis* apresentam efeito adjuvante em camundongos quando associados com a rgD de BoHV-5. Esses resultados abrem perspectivas para realização de pesquisas mais aprofundadas sobre as propriedades imunomoduladoras de esporos de *B. toyonensis* e de sua possível utilização como adjuvante em vacinas de subunidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BABIUK, L. A; VAN DRUNEN, L. D. H; TIKOO, S. K. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 31–42, 1996.
- COUTELIER, J. P. et al. IgG2a restriction of murine antibodies elicited by viral infections. **Journal of Experimental Medicine**, v. 165, p. 64-69, 1987.
- DE SOUZA, R. D. et al., Bacillus subtilis Spores as Vaccine Adjuvants: Further Insights into the Mechanisms of Action. **PLoS ONE**, v. 9, 2014.
- DUMMER, L. A. et al. Immune response in mice against recombinant bovine herpesvirus 5 glycoprotein D. **Vaccine**, v.32, p.2413–2419, 2014.
- 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.
- GERAGHTY, R. J et al. Cellular expression of Alpha herpesvirus gD interferes with entry of homologous and heterologous Alpha herpesvirus by blocking access to a shared gD receptor. **Virology**, v. 268, p. 147-158, 2000.
- HUANG, J. M. et al. Immunostimulatory activity of Bacillus spores. **FEM Immunology and Medical Microbiology**, v. 53, p. 95-203, 2008.
- HUANG, J. M. et al. Mucosal delivery of antigens using adsorption to bacterial spores. **Vaccine**, v. 28, p. 1021-1030, 2010.
- 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.
- MBOW, M. L et al. New adjuvants for human vaccines. **Current Opinion Immunology**, v. 22, n. 3, p. 411–416, 2010.
- NIMMERJAHN, F. & RAVETCH, J. V., Divergent immunoglobulin G subclass activity through selective Fc receptor binding. **Science**, v. 310, p. 1510-1512, 2005.
- WILLIAMS, L. D et al. Literature review on the safety of Toyocerin®, a non-toxicogenic and non-pathogenic Bacillus cereus var. toyoi preparation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 55, 236-246, 2009.
- 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, p. 133-142, 2018.