

ESPOROS DE *BACILLUS TOYONENSIS* COMO ADJUVANTE DE VACINA RECOMBINANTE CONTRA HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5

LUCAS REICHERT MAUBRIGADES¹; FRANCISCO DENIS SOUZA SANTOS²;
VITÓRIA SEQUEIRA GONÇALVES³; NEIDA CONRAD⁴; 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 – conradneida@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com

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 e apresenta capacidade de esporular. É comumente utilizada como probiótico na alimentação humana e animal (WILLIANS 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).

O Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é o agente da meningoencefalite herpética dos bovinos. Vacinas de subunidades contra os herpes vírus 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 (BABIUUK et al., 1996). A glicoproteína D é essencial para penetração do vírus nas células hospedeiras (GERAGHTY et al., 2000) e a vacinação com a proteína recombinante (rgD) foi capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes contra o BoHV-5 em camundongos (ROOS et al., 2014) e também em bovinos (ARAÚJO, 2014). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito adjuvante de esporos de *Bacillus toyonensis* associados a gD recombinante (rgD) de BoHV-5, observando a resposta imune celular dos 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 20 mL. Após, foi mantido em banho-maria a 68 °C por 3 horas para inativação 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.

Camundongos Swiss, fêmeas, de 28 dias de idade, foram divididos em seis grupos experimentais que receberam tratamentos distintos, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais de acordo com o tratamento

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

Todos os animais foram inoculados nos dias 0 e 21 do experimento por via subcutânea com um volume de 0,2 mL da respectiva formulação vacinal. No dia 42, os camundongos de todos os grupos experimentais foram eutanasiados e seu baço coletado e macerado para realização de cultivo de esplenócitos.

A resposta imune celular foi verificada através da quantificação da transcrição de mRNA de citocinas de esplenócitos dos camundongos, por meio da técnica de qPCR segundo DE AVILA et al. (2016). A análise estatística foi realizada utilizando análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett's, com o auxílio do software GraphPadPrism 11 v7.0d (GraphPad Software, CA, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As células do baço, quando estimuladas com a rgD, mostraram um perfil distinto de transcrição de mRNA das citocinas estudadas. Quando observados os níveis de expressão relativa de IL-4, notou-se que o grupo que recebeu rgD associado a esporos vivos apresentou níveis significativos ($p < 0,05$) de 2.6 vezes maiores quando comparado ao grupo rgD + PBS. O mesmo padrão foi observado no grupo rgD + alumen, que apresentou níveis superiores ($p < 0,05$) de IL-4 e IL-10 quando comparados aos grupos que receberam os esporos vivos e inativados adsorvidos ao alumen (Figura 1). As citocinas IL-4 e IL-10 são características de uma resposta celular do tipo Th2 (MBOW et al., 2010). O adjuvante alumen tem a capacidade de estimular células do sistema imune inato através da via de ativação do inflamassoma NLRP3, promovendo a diferenciação de linfócitos T virgem em linfócitos Th2 (MBOW et al., 2010), como observado no presente trabalho.

Quando analisados os níveis de transcritos de mRNA de IL-17 e IFN- γ , foi observado que o grupo rgD + esp. vivo apresentou níveis 19.2 vezes maiores ($p<0,05$) de IFN- γ quando comparado ao grupo rgD + PBS. Os grupos rgD + esp. vivo + alumén e rgD + esp. inat + alumén apresentaram a mesma tendência, com níveis 66.4 vezes e 57.5 vezes maiores de IFN- γ ($p<0,05$), respectivamente, e níveis 14.3 vezes e 4 vezes maiores ($p<0,05$) de IL-17, respectivamente, quando comparados ao grupo rgD + alumén (Figura 1). O IFN- γ é uma citocina característica de uma resposta do tipo Th1, fundamental em uma resposta antiviral (FENSTERL & SEN, 2009). Devido aos níveis elevados de IFN- γ nos grupos que receberam a vacina contendo esporos, pode-se sugerir que o uso dos esporos na formulação vacinal seja eficaz em induzir uma resposta favorável ao controle da infecção viral pelo BoHV-5. A IL-17 é produzida principalmente por linfócitos Th17 e também é uma citocina pró-inflamatória, capaz de induzir a ativação e proliferação de linfócitos B e de estimular a troca de isotipos de anticorpos IgG para IgG1, IgG2a e IgG2b (MITSDOERFFER et al., 2010). Tal processo pode ser importante em uma infecção viral por BoHV-5, visto que esses isotipos são capazes de ativar mecanismos de defesa contra uma infecção viral, como a opsonização (MITSDOERFFER et al., 2010).

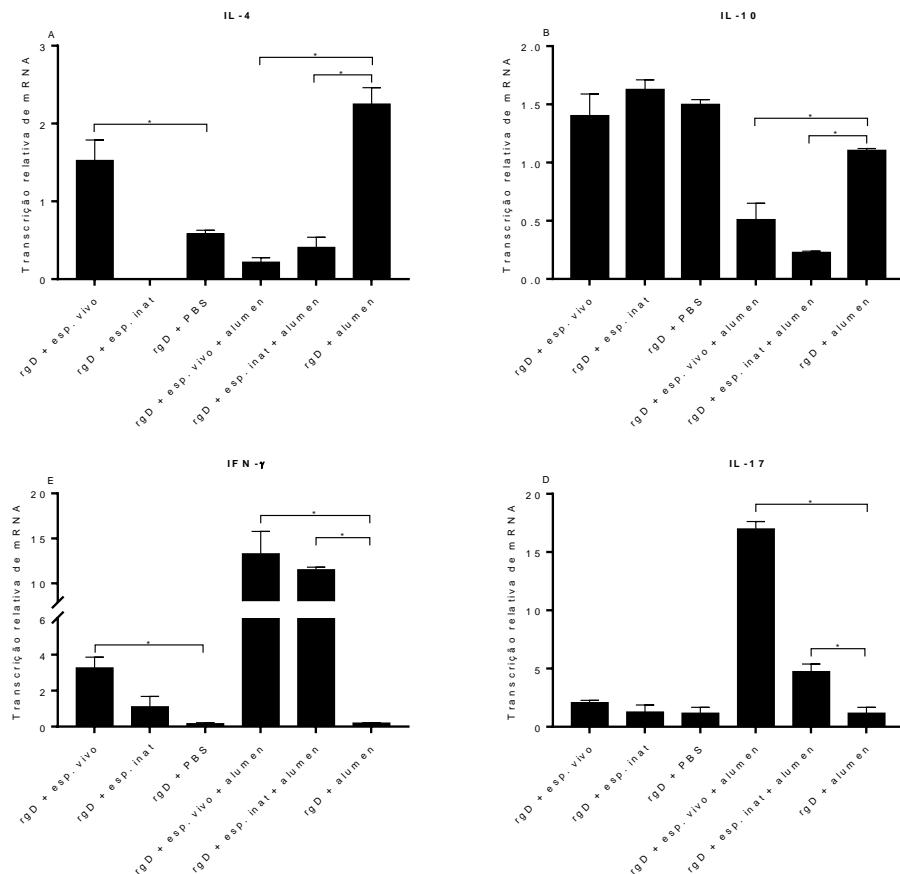


Figura 1. Transcrição de mRNA das citocinas IL-4, IL-10, IL-17 e IFN- γ em esplenócitos de camundongos vacinados com a rgD de BoHV-5 associados a esporos de *B. toyonensis* ou ao adjuvante alumén. Os asteriscos significam que há diferença estatística entre os grupos indicados. Análise estatística realizada por one-way ANOVA seguida pelo teste de Dunnett's. * $p<0,05$

4. CONCLUSÕES

O presente estudo sugere que esporos de *B. toyonensis* apresentam efeito adjuvante em camundongos quando associados com a rgD de BoHV-5,

modulando a resposta imune celular. Esses resultados abrem perspectivas para a 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.
- 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 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.
- FENSTERL, V.; SEN, G. C. Interferons and viral infections. **BioFactors**. v. 35, n. 1, p. 14-20, 2009.
- 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 Alphaherpesvirus gD interferes with entry of homologous and heterologous Alphaherpesvirus 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. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 53, p. 95-203, 2008.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- WILLIAMS, L. D et al. Literature review on the safety of Toyocerin®, a non-toxicogenic and non-pathogenic *Bacillus cereus* var. *toyoii* preparation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 55, 236-246, 2009.