RENATA DAMÁSIO DE SOUZA

**ESPOROS DE *BACILLUS SUBTILIS* COMO
ADJUVANTE VACINAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2014

RENATA DAMÁSIO DE SOUZA

**ESPOROS DE *BACILLUS SUBTILIS* COMO
ADJUVANTE VACINAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Souza, Renata Damásio de.

Esporos de *Bacillus subtilis* como adjuvante vacinal / Renata Damásio de Souza. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Desenvolvimento de novas estratégias vacinais.

Versão do título para o inglês: *Bacillus subtilis* spores as a vaccine adjuvant.

1. *Bacillus subtilis* 2. Esporos 3. Métodos de purificação 4. Vacina 5. Adjuvante 6. Gag-p24 I. Ferreira, Prof. Dr. Luis Carlos de Souza II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB085/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Renata Damásio de Souza.

Título da Tese: Esporos de *Bacillus subtilis* como adjuvante vacinal.

Orientador(a): Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **045** nas fls. **05** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Luis Carlos de Souza Ferreira**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Esporos de Bacillus subtilis como adjuvante vacinal*" do qual participam o(s) aluno(s), **Renata Damásio de Souza, Milene Batista Tavares, Rafael Ciro Marques Cavalcante, Wilson Barroas Luiz**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **02.05.2013**, com validade de 4 anos.

São Paulo, 9 de maio de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

***Aos meus pais, Lourdes e Nildio,
pelo apoio incondicional em
todos os momentos.***

***À minha avó Cirila (in memoriam)
que ficaria feliz por ver
o quão longe eu cheguei.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, a Nossa Senhora Aparecida e a Santo Expedito, por terem sempre me abençoado, me dado forças e *iluminado* meu caminho para que eu pudesse concluir mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais, Lourdes e Nildio, pelo apoio, compreensão, simplicidade, e por terem sempre acreditado em mim e investido nos meus estudos. À minha família, em especial à minha tia Teresa, pelo carinho e por torcerem pelo meu sucesso.

Ao Prof. Luís Carlos de Souza Ferreira, meu orientador, por acreditar que eu era capaz e pela sua orientação. Só tenho a agradecer pelo seu incentivo ao meu desenvolvimento científico e profissional, pelas dicas fortemente sugeridas e pelo respeito e compreensão, principalmente após eu ter escolhido outro caminho profissional.

À Profa. Rita de Cássia Café Ferreira por suas dicas profissionais, sua alegria e carinho com o laboratório. À Dra. Maria Elizabete Sbrogio-Almeida (Bete) pelos ensinamentos com os camundongos e pelo carinho e mimos ao longo destes anos.

Ao glorioso e “generally regarded as safe” grupo *Bacillus*: Wilson, Rafael, e Milene. Obrigada pela ajuda profissional, companheirismo, alegria e até pelos arranca-rabos. Aprendi muito trabalhando com vocês. Sentirei muitas saudades e guardarei boas lembranças.

Ao Dr. Juliano Paccez (Dom Juliano), pelos ensinamentos, orientações, incentivo, amizade, dedicação e piadas de gosto duvidoso. Você esteve ao meu lado durante cinco anos e não mediu esforços para me ajudar. Serei sempre grata.

À Dra. Milene (Batista Tavares ou Tavares Batista? Nunca saberei.) pela amizade e por ser um exemplo de dedicação. Obrigada pela grande ajuda, incontáveis conversas, muitas risadas e por aguentar as minhas bizarrices em terras europeias.

Aos estimados integrantes do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas: Mari Diniz, Bruna, Luana, Marcinha, Jamile, Natiely, Jucinha, Mari Cintra, Deni, Raízinha, Jâime, Rúbens, Ewerton, Dalva, Lennon, Naína, Mônica, Domingos, Sara e Hélic. Vocês são pessoas ímpares, fico muito feliz por ter convivido com vocês! Obrigada pela amizade, colaboração profissional, muitas risadas, caravanas para bandeirão, conselhos pessoais, desabafos, fofocas, guloseimas (reais e virtuais) e

conversas sobre seriados. Em especial, agradeço ao Cariri por sempre estar disposto a ajudar e a conversar sobre as incertezas profissionais e à Camila Mathias, pela amizade, companheirismo e por ter me oferecido uma vaga no apartamento e camundongos nocautes para Toll 2.

Aos colegas que não mais integram a equipe do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, mas que colaboraram de alguma forma para meu crescimento pessoal e profissional: Roberto, Bruno (Tintim), Camila Lauand, Luana, Liliana, Elisa, Hugo, Melissa, Cristiane, Fabiano, Eduardo, Otto, Camila Calderon, Sabrina, Naomi, Karine, Dani, Débora, Aline, Carol Rivillas, Vinícius, Adriano, Mari Waligora, Robert e Catarina. Em especial às queridas Priscila “menininha” Gomes e Caroline Casaroli, pelas conversas, risadas, chocolates, maquiagens e “bafões”.

Aos amigos da Biologia 05 Noturno (porque noturno é bem melhor) em especial a Denise Weitzen Raupp Moore e a Ms Jenifer Lopes. Jeni, obrigada por todos estes anos de amizade e por sempre estar junto, me apoiando e ajudando nas minhas decisões.

Aos meus grandes amigos de Caracas e arredores: Mara, Zi Mey, Eva, Help, Erika e Rivas que me ajudaram a manter minha sanidade mental. E às C.U.P.S. (Natália Augusta, Verônica Carolina, Xandis e Paty), pois mesmo estando separadas, continuamos a ser um grupo unido.

À Loren, Lilian e Carolina pelo suporte técnico e auxílio na organização do laboratório. Agradeço especialmente ao Eduardo pela inestimável ajuda em tudo (inclusive para arrumar caixas vazias).

Aos funcionários e amigos do biotério da Parasitologia (Sandra, Juliane, Danielle e Luís) pela competência, ajuda, ensinamentos, “quebra-galhos” e risadas. Ao Carlos do biotério da Microbiologia pela competência e carinho com os camundongos, os quais foram essenciais ao meu trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, em especial à Gisele, pelo suporte em todos os momentos.

Às agências de fomento FAPESP, CNPq e CAPES pelo suporte financeiro, sem o qual seria impossível realizar este trabalho.

Sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Este trabalho foi realizado sob orientação do Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira, no Centro de Vacinas e Terapia Gênica (CEVAT – GENE), no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

"No meio de uma dificuldade, existe uma oportunidade".

(Albert Einstein)

RESUMO

SOUZA, R. D. **Esporos de *Bacillus subtilis* como adjuvante vacinal**. 2014. 117 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Esporos de *Bacillus subtilis* têm aplicações em diversos campos, incluindo a sua utilização como probióticos e vetores de entrega de antígenos. Os esporos também podem se comportar como adjuvantes vacinais, promovendo o aumento de respostas de anticorpos após a coadministração de antígenos misturados ou adsorvidos à superfície do esporo. No entanto, tais aplicações especializadas requerem preparações altamente purificadas de esporos com rendimentos elevados. Em uma tentativa de melhorar a reprodutibilidade do processo e a obtenção de amostras com elevado grau de pureza e rendimentos razoáveis, foi realizada uma análise quantitativa sistemática das condições de esporulação e dos métodos de purificação de esporos. Com base nos resultados obtidos durante o estudo, foi estabelecido um método que permitiu altas frequências de esporulação e definiram-se os passos mais importantes para a purificação de esporos. Em seguida, ainda avaliamos as propriedades imunomodulatórias dos esporos de *B. subtilis*, utilizando uma proteína recombinante Gag-p24 do HIV-1 recombinante como antígeno modelo. Os efeitos adjuvantes dos esporos de *B. subtilis* não foram afetados pelo *background* genético das linhagens de camundongos e não induziu efeitos inflamatórios ou deletérios significativos após a administração parenteral. Os nossos resultados demonstraram que a coadministração, mas não a adsorção à superfície do esporo, aumentou a imunogenicidade do antígeno alvo após a imunização subcutânea em camundongos BALB/c e C57BL/6. Os esporos promoveram a ativação das células apresentadoras de antígenos, como demonstrado pela regulação positiva de moléculas de MHC e moléculas CD40 e aumentou a secreção de citocinas pró-inflamatórias por células dendríticas de camundongos. Ademais, estudos *in vivo* indicaram um papel direto da imunidade inata nas propriedades imunomoduladoras dos esporos de *B. subtilis*, como demonstrado pela ausência do efeito adjuvante em camundongos nocautes para MyD88 e TLR2. Em conclusão, esses resultados abrem perspectivas interessantes para a utilização de esporos de *B. subtilis* como adjuvantes vacinais.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*. Esporos. Métodos de Purificação. Adjuvante. Gag-p24.

ABSTRACT

SOUZA, R. D. ***Bacillus subtilis* spores as a vaccine adjuvante**. 2014. 117 p. Ph. D. thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Bacillus subtilis spores have applications in different fields including their use as probiotics and antigen delivery vectors. The spores have also been shown to behave as vaccine adjuvants, promoting the increase of antibody responses after co-administration with antigens either admixed or adsorbed on the spore surface. Nonetheless, such specialized applications require highly purified spore preparations at high yields. In an attempt to improve the reproducibility of the method and obtain samples at high purity and at reasonable recovery yields, we performed a systematic quantitative analysis of sporulation conditions and spore purification methods. Based on the results generated during this study, we established a methodology which allowed high sporulation frequencies and defined the most important steps required for the purification of spores. Afterwards, we further evaluated the immune modulatory properties of *B. subtilis* spores using a recombinant HIV-1 Gag-p24 protein as a model antigen. The adjuvant effects of *B. subtilis* spores were not affected by the genetic background of the mouse lineage and did not induce significant inflammatory or deleterious effects after parenteral administration. Our results demonstrated that co-administration, but not adsorption to the spore surface, enhanced the immunogenicity of that target antigen after subcutaneous administration to BALB/c and C57BL/6 mice. Spores promoted activation of antigen presenting cells as demonstrated by the up-regulation of MHC and CD40 molecules and enhanced secretion of pro-inflammatory cytokines by murine dendritic cells. In addition, in vivo studies indicated a direct role of the innate immunity on the immunomodulatory properties of *B. subtilis* spores, as demonstrated by the lack of adjuvant effects on MyD88 and TLR2 knockout mouse strains. In conclusion, these results open interesting perspectives for the use of *B. subtilis* spores as vaccine adjuvants.

Keywords: *Bacillus subtilis*. Spores. Purification methods. Adjuvant. Gag-p24.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da estrutura do esporo de <i>B. subtilis</i>	22
Figura 2. Representação esquemática do vírus HIV-1	32
Figura 3. Frequência de esporulação da linhagem WW02 de <i>B. subtilis</i> cultivada em meio DSM.....	45
Figura 4. Frequência de esporulação da linhagem WW02 de <i>B. subtilis</i> cultivada em meio F	46
Figura 5. Avaliação da pureza dos esporos após a aplicação dos métodos de purificação	47
Figura 6. Avaliação do rendimento total de esporos após a aplicação dos métodos de purificação	48
Figura 7. Exame microscópico da preparação de esporos após aplicação de diferentes métodos de purificação.....	50
Figura 8. Adsorção da proteína p24 na capa dos esporos de <i>B. subtilis</i>	51
Figura 9. Ensaio de Dot-blot utilizado na quantificação do total de proteína adsorvida em 2×10^9 UFC de esporos de <i>B. subtilis</i>	52
Figura 10. Adsorção de diferentes concentrações de p24 durante o período de 1 hora em solução de PBS 1x com pH 4.....	53
Figura 11. Adsorção da proteína p24 na capa dos esporos de <i>B. subtilis</i> , em solução de PBS 1x com pH 4, durante diferentes intervalos de tempo... ..	53
Figura 12. Estabilidade da ligação da proteína p24 à capa dos esporos de <i>B. subtilis</i>	54
Figura 13. Indução da produção de anticorpos séricos (IgG) contra p24 em camundongos BALB/c imunizados pela via subcutânea	56
Figura 14. Indução da produção de anticorpos séricos (IgG) contra p24 em camundongos C57BL/6 imunizados pela via subcutânea	57
Figura 15. Indução da produção de anticorpos séricos (IgG) contra esporos em camundongos BALB/c imunizados pela via subcutânea	58

Figura 16. Indução da produção de anticorpos séricos (IgG) contra esporos em camundongos C57BL/6 imunizados pela via subcutânea	59
Figura 17. Resposta de anticorpos séricos (IgG) contra p24 em camundongos BALB/c imunizados com esporos vivos ou inativados pela via subcutânea.....	61
Figura 18. Resposta de anticorpos séricos (IgG) contra p24 em camundongos C57BL/6 imunizados com esporos vivos ou inativados pela via subcutânea	61
Figura 19. Determinação da avidéz dos anticorpos específicos contra o antígeno p24, gerados em camundongos BALB/c	62
Figura 20. Determinação da avidéz dos anticorpos específicos contra o antígeno p24, gerados em camundongos C57BL/6	63
Figura 21. Avaliação da produção de isotipos de IgG específicos para p24 7após a imunização de camundongos BALB/c.....	64
Figura 22. Avaliação da produção de isotipos de IgG específicos para p24 após a imunização de camundongos C57BL/6.....	64
Figura 23. Ativação de linfócitos T CD4+ produtores de IFN- γ específicos para p24, após 16 horas de estimulação <i>in vitro</i> dos esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados.	66
Figura 24. Ativação de linfócitos T CD4+ produtores de IFN- γ específicos para p24, após 72 horas de estimulação <i>in vitro</i> dos esplenócitos de camundongos C57BL/6 imunizados	67
Figura 25. Ativação de linfócitos T CD4+ produtores de IL-4 específicos contra p24, após 16 horas de estimulação <i>in vitro</i> dos esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados	68
Figura 26. Ativação de linfócitos T CD4+ produtores de IL-4 específicos contra p24, após 72 horas de estimulação <i>in vitro</i> dos esplenócitos de camundongos C57BL/6 imunizados.	69
Figura 27. Ativação de linfócitos T CD8+ produtores de IFN- γ específicos para p24, após 16 horas de estimulação <i>in vitro</i> dos esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados..	70

Figura 28. Ativação de linfócitos T CD8+ produtores de IFN- γ específicos para p24, após 72 horas de estimulação <i>in vitro</i> dos esplenócitos de camundongos C57BL/6 imunizados.....	71
Figura 29. Corte histológico e coloração HE dos linfonodos inguinais de camundongos BALB/c.....	73
Figura 30. Corte histológico e coloração HE dos linfonodos inguinais de camundongos C57BL/6.....	74
Figura 31. Níveis de lactato desidrogenase (LDH) presentes no soro de camundongos BALB/c.....	76
Figura 32. Níveis de lactato desidrogenase (LDH) presentes no soro de camundongos C57BL/6.....	76
Figura 33. Indução de citocinas pró-inflamatórias depois da estimulação das células dendríticas com esporos vivos ou inativados	77
Figura 34. Expressão de moléculas de superfície pelas células dendríticas CD11c ⁺ após a exposição com esporos de <i>B. subtilis</i>	78
Figura 35. Comparação gráfica da expressão das moléculas CD40, MHC classe I e MHC classe II.....	79
Figura 36. Indução da produção de anticorpos séricos (IgG) contra p24 em camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para MyD88.....	81
Figura 37. Indução da produção de anticorpos séricos (IgG) contra p24 em camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para TLR2	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Adjuvantes licenciados para uso em humanos	25
Tabela 2. Comparação entre os métodos de purificação de esporos de <i>B. subtilis</i>	49
Tabela 3. Descrição da composição de cada dose recebida pelos diferentes grupos de imunização.	55
Tabela 4. Descrição da composição de cada dose recebida pelos diferentes grupos de imunização	60
Tabela 5. Descrição da composição de cada dose recebida pelos diferentes grupos de imunização	65
Tabela 6. Análise hematológica dos camundongos imunizados com esporos de <i>B. subtilis</i>	75
Tabela 7. Descrição da composição de cada dose recebida pelos diferentes grupos de imunização	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACK	<i>Ammonium-Chloride-Potassium</i>
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análise de Variância simples)
APC	<i>Antigen presenting cells</i> (células apresentadoras de antígeno)
AS	<i>Adjuvant system</i> (sistema adjuvante)
BSA	Bovine serum albumin (Albumina do soro bovino)
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (grupo de diferenciação)
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i> (Célula T citotóxica)
Cy	Cianina
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i> (Padrões moleculares associados a dano tecidual)
DC	<i>Dendritic cells</i> (células dendríticas)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
D.O.	Densidade óptica
DSM	<i>Difco Sporulation Medium</i> (Meio de esporulação da Difco)
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetraacético)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima)
Env	<i>Envelope protein</i> (Proteína do envelope)
ETEC	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica)
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FITC	Fluoresceína
Gag	<i>Group specific antigen</i> (Antígeno específico de grupo)
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> (fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos)
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)

IL	Interleucina
INF- γ	Interferon gamma
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Subclasse tipo 1 de imunoglobulina G
IgG2a	Subclasse tipo 2a de imunoglobulina G
IgG2c	Subclasse tipo 2c de imunoglobulina G
KDa	Kilodalton
LB	Meio Lurian-Bertani
LPS	Lipolissacarídeo
LT	<i>Heat-labile toxin</i> (toxina termo-lábel)
Leu	Leucina
MHC	<i>Major histocompatibility complex class</i> (complexo principal de histocompatibilidade)
Met	Metionina
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i> (Intensidade de fluorescência média)
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i> (Fator de diferenciação mielóide 88)
Nlrp3	<i>NOD-like receptor family pyrin domain containing 3</i> (proteína receptora do tipo NOD contendo 3 domínios pirina)
OPD	Ortofenilenodiamina
OVA	Ovalbumina
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern (Padrões moleculares associados aos patógenos)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato-salino)
PE	Ficoeritrina
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i> (Receptor de reconhecimento de padrão)
Pol	<i>Polymerase</i> (Polimerase)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute

SD	<i>Standard deviation</i> (desvio padrão)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Dodecil sulfato de sódio)
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Erro padrão da média)
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i> (ácido tricloroacético)
TNF- α	<i>Tumor necrosis fator alfa</i> (fator de necrose tumoral alfa)
Th	<i>Cells T helper</i> (células T auxiliaadoras)
Tir	<i>Toll/interleukin-1 receptor</i> (receptor Toll/Interleucina-1)
TLR	<i>Toll-like receptor</i> (receptor do tipo toll)
TMB	<i>Tetramethylbenzidine</i>
Trp	Triptofano
TTFC	<i>Tetanus Toxin C-Fragment</i> (Fragmento C da Toxina Tetânica)
UFC	Unidade formadora de esporos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Adjuvantes vacinais e o sistema imune	22
1.2 Esporos de <i>Bacillus subtilis</i> e seu efeito adjuvante	26
1.3 Produção e purificação de esporos de <i>B. subtilis</i>	29
1.4 A proteína p24 como antígeno alvo	31
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo geral	34
2.2 Objetivos específicos	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Linhagem bacteriana e condições de crescimento	35
3.2 Preparação dos esporos	35
3.3 Determinação da frequência de esporulação	35
3.4 Purificação dos esporos	36
3.5 Determinação da pureza, do rendimento de recuperação e da eficácia dos métodos de purificação de esporos	36
3.6 Análise das amostras por microscopia	37
3.7 Adsorção de proteínas na capa do esporo	37
3.8 Quantificação das proteínas adsorvidas na capa do esporo	38
3.9 Imunização e processamento das amostras	38
3.10 Detecção de respostas de anticorpos séricos	39
3.11 Ensaio de avididade dos anticorpos específicos contra p24	39
3.12 Determinação das respostas de linfócitos T CD4+ e TCD8+	40
3.13 Análise histológica dos linfonodos	41
3.14 Hemograma dos camundongos imunizados	41

3.15 Monitoramento de marcadores bioquímicos para reações inflamatórias.....	41
3.16 Diferenciação <i>in vitro</i> de células dendríticas a partir da medula óssea de camundongos.....	41
3.17 Incubação de células dendríticas com esporos de <i>B. subtilis</i>.....	42
3.18 Análise das amostras por ELISA de citocinas	42
3.19 Análise das amostras por citometria de fluxo.....	43
3.20 Análise estatística.....	43
4 RESULTADOS	44
4.1 Capítulo I.....	44
4.1.1 Efeito das condições de cultivo na esporulação de <i>B. subtilis</i>	44
4.1.2 Determinação da pureza dos esporos após a utilização de diferentes métodos de purificação	46
4.1.3 Determinação do rendimento de esporos e da eficácia geral dos procedimentos de purificação	47
4.1.4 Avaliação microscópica das amostras purificadas.....	49
4.2 Capítulo II.....	51
4.2.1 Adsorção da proteína p24 na capa dos esporos.....	51
4.2.2 Efeito adjuvante das diferentes estratégias na indução de uma resposta humoral contra p24	54
4.2.3 Comparação do efeito adjuvante dos esporos vivos com os esporos inativados por calor.....	59
4.2.4 Avaliação do efeito adjuvante dos esporos vivos e inativados na indução de uma resposta celular contra p24.....	63
4.2.5 Avaliação da segurança dos esporos de <i>B. subtilis</i> como adjuvante vacinal.....	72
4.2.6 Maturação das células dendríticas pelos esporos de <i>B. subtilis</i>	77

4.2.7 A importância dos receptores do tipo Toll para o efeito adjuvante dos esporos de <i>B. subtilis</i>	79
5 DISCUSSÃO	83
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
REFERÊNCIAS	89
APÊNDICE A - <i>Bacillus subtilis</i> endospores at high purity and recovery yields: optimization of growth conditions and purification method.....	97
APÊNDICE B - <i>Bacillus subtilis</i> spores as vaccine adjuvants: further insights into the mechanisms of action	104
APÊNDICE C – Súmula curricular.....	114

1 INTRODUÇÃO

1.1 Adjuvantes vacinais e o sistema imune

A vacinação é, predominantemente, uma medida preventiva que visa induzir respostas imunes humorais e celulares que protegerão o hospedeiro de uma posterior exposição a um agente patogênico (MIYAJI et al., 2011). Formulações de vacinas tradicionais são baseadas em patógenos inteiros (inativados ou atenuados) e, embora este modelo de vacina tenha sido bem sucedido para prevenir certas doenças infecciosas, vacinas baseadas em microrganismos inteiros não foram desenvolvidas com êxito para muitos agentes patogênicos (COFFMAN; SHER; SEDER et al., 2010). Os problemas incluem reações adversas nos hospedeiros, reversão de virulência, e a incapacidade de se cultivar o patógeno de forma eficiente. Problemas logísticos enfrentados pelas vacinas tradicionais incluem a necessidade de manter a cadeia de frio: uma série ininterrupta de refrigeração, armazenamento, transporte e distribuição (HEFTI; DAVID, 2013).

As vacinas de subunidades, baseadas em pequenos e específicos fragmentos de um patógeno, proporcionam uma alternativa racional e atrativa em relação às vacinas tradicionais, visto que elas são mais seguras e imunologicamente mais definidas (O'HAGAN; RAPPUOLI, 2004). Infelizmente, vacinas baseadas em antígenos altamente purificados frequentemente induzem fraca resposta imunológica, devido à falta de moléculas derivadas de patógenos que agem como “sinais de perigo” e são necessárias para ativação eficiente do sistema imune inato e, conseqüentemente, para ativação de uma resposta imune adaptativa (ZAMAN; TOTH, 2013). Portanto, as vacinas compostas por antígenos não vivos requerem incorporação de adjuvantes para estimular adequadamente o sistema imunológico (KWISSA; KASTURI; PULENDRAN, 2007; PASHINE; VALIANTE; ULMER, 2005).

A palavra adjuvante deriva do latim “adjuvare” e significa “ajudar”, sendo o termo adjuvante designado a qualquer composto capaz de aumentar a imunogenicidade intrínseca de um antígeno coadministrado ou modular a resposta imunológica naturalmente induzida contra o antígeno (KRIEG, 2007; LYCKE, 2010). Adjuvantes representam um componente importante de muitas vacinas modernas, visto que eles aumentam a imunogenicidade de antígenos recombinantes altamente

purificados, reduzem a quantidade de antígeno administrada e o número de doses necessárias para induzir uma resposta protetora e aprimoram a eficiência das vacinas em indivíduos imunocomprometidos (LAMBRECHT et al., 2009; REED et al., 2008).

De um modo geral, os adjuvantes podem ser classificados como sistemas de entrega, imunopotenciadores, ou uma combinação de ambos. Sistemas de entrega, tais como sais minerais, emulsões e lipossomas, otimizam a apresentação dos antígenos ao sistema imune, através da liberação controlada e da formação de agregados que acabam protegendo o antígeno de uma rápida degradação (BLACK et al., 2010; LEROUX-ROELS, 2010). Imunopotenciadores, tais como as citocinas, saponinas e agonistas de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), aumentam a resposta imune contra os antígenos, estimulando as células imunes inatas diretamente. Estes adjuvantes ativam as APCs, culminando na secreção de citocinas pró-inflamatórias (como as Interleucinas 1 e 12 (IL-1 e IL-12) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α)) e no aumento dos níveis de moléculas co-estimulatórias (CD40, CD80, CD86) e de moléculas MHC classe I e/ou II, que são necessárias para o contato e ativação dos linfócitos T (BLACK et al., 2010; MONTOMOLI et al., 2011; VAN DUIN; MEDZHITOV; SHAW VAN DUIN, 2006). A maturação das APCs, especialmente das células dendríticas, levam a uma modulação da imunidade adaptativa, controlando o tipo, a qualidade e a magnitude da resposta imune e da memória (O'HAGAN; VALIANT, 2003; HEEGAARD et al., 2011; MONTOMOLI et al., 2011).

As DCs representam um elo crucial entre o sistema imune inato e o adaptativo, por meio da internalização e processamento do antígeno, seguida da apresentação de peptídeos antigênicos para os linfócitos T (BENDELAC; MEDZHITOV, 2002; BLACK et al., 2010; LAMBRECHT et al., 2009). A maneira como as DCs são ativadas pelos patógenos pode ser de forma direta, pelo reconhecimento de moléculas microbianas altamente conservadas, conhecidas como padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs); ou de forma indireta por meio do reconhecimento de padrões moleculares associados a dano tecidual (DAMPs), liberados por várias células quando acometidas por diferentes tipos de estresse, que são capazes de ativar receptores do sistema imune de forma similar a padrões bacterianos (LAMBRECHT et al., 2009; MIYAJI et al., 2011).

A ativação das DCs pelos PAMPs é mediada, predominantemente, por receptores do tipo Toll (TLR), os quais são proteínas transmembrana evolutivamente conservadas, caracterizadas por um domínio contendo repetições ricas em leucina, que interage com os PAMPs e DAMPs, e uma cauda citoplasmática que contém um domínio associado ao receptor Toll/Interleucina-1 (TIR), que interage com as vias de sinalização a jusante (BELL et al., 2003; O'NEILL; BOWIE, 2007). Utilizando moléculas adaptadoras como o fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), os TLRs iniciam uma cascata de sinalização que leva a ativação de quinases e fatores de transcrição, culminando na maturação das células dendríticas (RUECKERT; GUZMAN, 2012). Além da secreção de citocinas e expressão de moléculas MHC e co-estimulatórias, a ativação das células dendríticas provoca a sua migração dos tecidos periféricos para os linfonodos regionais, onde apresentam os antígenos para os linfócitos T naive, promovendo a proliferação e diferenciação destes. Linfócitos T CD8 se diferenciam em células T citotóxicas (CTLs), que matam células infectadas ou tumorais, enquanto linfócitos T CD4 se diferenciam em células T auxiliares (Th) do tipo Th1, que ativam processos fagocíticos e citotóxicos em células efetoras, ou do tipo Th2, que auxiliam na diferenciação de linfócitos B em células secretoras de anticorpos (O'HAGAN; VALIANTE, 2003; STEINMAN; POPE, 2002).

Treze TLRs já foram identificados em mamíferos, sendo que destes, dez receptores (TLRs 1-10) já foram descritos em humanos e doze receptores (TLR 1-9 e TLR 1-13) em camundongos (KAWAI; AKIRA, 2010). Estes receptores podem estar localizados na superfície das células ou na membrana dos endossomos e possuem especificidades diferentes aos componentes microbianos, tais como lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas (TLR4), ácido lipoteicóico de bactérias Gram-positivas (TLR2), RNA de fita dupla (TLR3), flagelina (TLR5), RNA fita simples (TLR7), Sequência não metilada de cistidina e guanina do DNA, mais conhecida como CPG DNA (TLR9), entre outros (BELL et al., 2003; GUY, 2007; MIYAJI et al., 2011). A modulação da resposta imune contra um antígeno vacinal pode ser alcançada usando formulações contendo PAMPs e/ou DAMPs, por causa disso, vários agonistas de TLRs (naturais ou artificiais) estão sendo avaliados como candidatos a adjuvantes vacinais.

Embora efetivos adjuvantes vacinais já tenham sido identificados, poucos foram aprovados para uso em humanos (Tabela 1). Este reduzido número deve-se, principalmente, à preocupação com a segurança destes adjuvantes, visto que

potentes imunoestimuladores podem desencadear inflamações locais ou generalizadas e até doenças autoimunes, como foi observado com o adjuvante de Freund em modelo animal (LEENAARS et al., 1998; STILLS, 2005).

Tabela 1 – Adjuvantes licenciados para uso em humanos.

Adjuvante (data da aprovação)	Classe	Componente	Vacina (doença)
Alúmen (1924)	Sais minerais	Fosfato ou Hidróxido de Alumínio	Várias
MF59 (1997)	Emulsão óleo/água	Esqualeno, Polissorbato 80, Triolato de sorbitan	Fluad (influenza sazonal), Focetria (influenza pandêmica)
AS03 (2009)	Emulsão óleo/água	Esqualeno Tween 80 e tocoferol	Pandremix (influenza pandêmica)
Virosomes (2000)	Lipossomos	Lipídeos, hemaglutinina	Inflexal (influenza sazonal), Epaxal (Hepatite A)
AS04 (2005)	Agonista de TLR4 adsorvido ao Alúmen	Monofosforil lipídeo A (MPL), Hidróxido de Alumínio	Fendrix (Hepatite B), Cervarix (vírus do papiloma humano)

Fonte: Baseado em Rappuoli et al., 2011.

Alúmen é um eficiente adjuvante para doenças contra as quais a resposta de anticorpos neutralizantes é necessária, como tétano e difteria. Ele gera uma resposta imune com perfil Th2, mas é pobre em induzir uma resposta imune do tipo Th1, importante para o desenvolvimento de vacinas contra patógenos intracelulares (COFFMAN; SHER; SEDER et al., 2010; KOOL; FIERENS; LAMBRECHT, 2012; MBOW et al., 2010). Vacinas com alumínio têm um longo registro de segurança, apesar de causarem algumas reações locais de gravidade variada, como nódulos, granulomas, eritemas, e uma síndrome progressiva caracterizada por desgaste muscular e grave fadiga chamada miofascite macrofágica (CLEMENTS; GRIFFITHS, 2002; JEFFERSON; RUDIN; DI PIETRANTONJ, 2004). Além de não ser eficaz com todos os antígenos, o mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado. Por um bom tempo considerou-se que o efeito adjuvante dos sais de alumínio era devido à formação de um depósito no sítio de inoculação, que aumentava a captura do antígeno (MOREFIELD et al., 2005). Atualmente, sabe-se que a ativação do inflamassoma NLRP3 pelo alúmen leva a ativação das DCs e o subsequente desenvolvimento de uma resposta Th2 (EISENBARTH et al., 2008; LI et al., 2008). Entretanto, o papel da via de ativação do inflamassoma ainda é controverso, visto

que alguns estudos provaram que a ausência de NLRP3 não impacta significativamente a respostas de células T e B em camundongos imunizados com alúmen (FRANCHI; NUNEZ et al., 2008; McKEE et al., 2009).

A combinação de alguns adjuvantes mostrou-se uma estratégia eficiente para ativação de diferentes sinais induzidos pelos PRRs, e algumas destas formulações já estão disponíveis em vacinas usadas em humanos (Tabela 1). Todavia, tais formulações de adjuvantes podem aumentar significativamente o custo da produção de vacinas, o que pode dificultar o acesso por grande parte da população mundial (MIYAJI et al., 2011). Ademais, ainda há um número significativo de importantes patógenos para os quais não existem vacinas eficazes, e os adjuvantes atualmente licenciados para uso em humanos são inadequados para o desenvolvimento destas novas vacinas.

A identificação e desenvolvimento de novos adjuvantes são de suma importância para permitir o desenvolvimento de vacinas contra estes alvos remanescentes. Adjuvantes modernos deve induzir uma resposta imune multifacetada, gerando uma produção de anticorpos heteróloga, para cobrir a diversidade do patógeno (O'HAGAN; GREGORIO, 2009). Além disso, um bom adjuvante, preferencialmente, deve ser um composto estável, com uma vida útil longa e baixo custo de produção e reduzida reatogenicidade. (HEEGAARD et al., 2011)

1.2 Esporos de *Bacillus subtilis* e seu efeito adjuvante

B. subtilis é um bacilo Gram-positivo, ubiqüitário, produtor de endósporos (a seguir referidos como esporos), sendo uma das espécies mais bem caracterizadas, o que resulta em uma variedade de ferramentas genéticas para sua manipulação (FERREIRA; FERREIRA; SCHUMANN et al., 2005; HARWOOD, 1992). É uma espécie não patogênica, que recebeu o status GRAS (*generally regarded as safe*) pelo FDA americano. Ademais, *B. subtilis* tem um histórico de segurança incontestável baseado na utilização comercial em todo o mundo de seus esporos como probióticos para humanos e animais e, em algumas regiões da Ásia e África, existe um grande consumo de alimentos à base de esporos (HONG; DUC; CUTTING, 2005; NEGRI et al., 2013; WANG; FUNG, 1996). Esporos de *B. subtilis* têm sido amplamente utilizados para estabilizar a microbiota intestinal de leitões, a

fim de melhorar os mecanismos de defesa indígena do animal sem perturbar as funções fisiológicas e bioquímicas (LARSEN et al., 2013).

Esporos são estruturas metabolicamente quiescentes e extremamente resistentes, produzidas pelas células vegetativas em resposta a condições ambientais adversas. Eles podem sobreviver neste estado de dormência por longos períodos de tempo, resistindo a diversas condições estressantes, como radiação ultravioleta, produtos químicos tóxicos (como peróxido e hipoclorito), altas temperaturas, desidratação e falta de nutrientes (DRICKS, 1999; HENRIQUES; MORAN, 2000; NICHOLSON et al., 2000). Embora o tempo de vida útil do esporo seja desconhecido, alguns pesquisadores encontraram esporos viáveis em amostras com idade variando entre décadas a milhares de anos (KENNEDY; READER; SWIERCZYNSKI, 1994).

A esporulação consiste em um processo de diferenciação celular que, em condições laboratoriais, começa na fase estacionária quando os nutrientes estiverem esgotados: a célula vegetativa replica seu DNA e se divide assimetricamente, distribuindo as cópias do seu genoma nos dois compartimentos. O menor dos compartimentos (o pré-esporo) é engolfado pela célula mãe, produzindo uma estrutura de membrana dupla. Ao longo do processo, ocorre a formação do córtex e a síntese e deposição de proteínas que formaram 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, na presença de nutrientes, será capaz de germinar rapidamente, originando uma célula vegetativa (DUC et al., 2004; McKENNEY; DRIKS; EICHENBERGER, 2013).

A habilidade do esporo de sobreviver a condições ambientais danosas está relacionada, em parte, com a presença de uma estrutura proteica, a capa, que envolve o esporo (Figura 1). Ao menos 70 proteínas diferentes (as proteínas Cot) formam esta estrutura de múltiplas camadas, composta pela parte basal, interna, externa e pela crosta, sendo que esta última foi recentemente apontada como a camada mais externa do esporo (IMAMURA et al., 2011; McKENNEY; DRIKS; EICHENBERGER, 2013).

Figura 1: Representação esquemática da estrutura do esporo de *B. subtilis*. As múltiplas camadas do esporo servem para proteger o genoma, que está localizado no núcleo do esporo (core). O core encontra-se protegido pelo córtex (verde), pela camada basal (azul), capa interna (laranja), capa externa (roxo) e crosta (vermelho). Fonte: Modificado de McKenney; Driks; Eichenberger, 2013.

Devido a sua estabilidade e segurança, o esporo é uma ferramenta biotecnológica ideal com diversas aplicações potenciais, incluindo veículos para entrega de antígenos vacinais e moléculas bioativas (KIM; SCHUMMAN, 2009; RICCA; CUTTING, 2003; TAVASSOLI et al., 2013). Em estudos anteriores, proteínas heterólogas foram eficientemente expostas na superfície do esporo, por meio da construção de linhagens recombinantes, em que o gene que codifica para a proteína alvo é fusionado a o gene que codifica para uma proteína exposta na superfície do esporo, como a CotB, CotC ou CotG. As proteínas recombinantes são sintetizadas durante a esporulação e ficam ancoradas na capa do esporo, onde serão apresentadas às células do sistema imune (DUC et al., 2003; ISTICATO et al., 2004; NEGRI et al., 2013; NING et al., 2011). Abordagens envolvendo a geração de vacinas contra *Clostridium tetani* pela expressão de antígenos na capa do esporo têm se mostrado promissoras, uma vez que são capazes de proteger os camundongos contra o desafio com a toxina tetânica (CIABATTINI et al., 2010; LEE et al., 2010; PERMPOONPATTANA et al., 2011).

Os esporos, por si só, são partículas imunogênicas. Camundongos que receberam preparações puras de esporos, por via oral, são capazes de gerar uma

resposta específica de Imunoglobulina A (IgA) secretora e IgG sistêmico, ademais a análise de RNA mensageiro de citocinas no tecido linfóide associado ao intestino apontaram uma indução de TNF- α e de Interferon gama (IFN- γ), uma citocina Th1 (DUC et al., 2004; HUANG et al., 2008). Recentemente, alguns estudos têm demonstrado que os esporos apresentam propriedades adjuvantes e são capazes de promover um aumento na resposta de anticorpos contra antígenos solúveis coadministrados a ele ou contra antígenos adsorvidos na capa dos esporos. (BARNES et al., 2007; HUANG et al., 2010; SONG et al., 2012).

Barnes e colaboradores mostraram que a coadministração dos esporos com o fragmento C da toxina tetânica (TTFC) ou com ovalbumina (OVA) influenciou na magnitude e na diversidade as respostas imunes contra os antígenos alvo, tanto em camundongos imunizados pela via subcutânea quanto pela via intranasal. Por outro lado, alguns estudos apontam que o efeito adjuvante foi alcançado após a adsorção das proteínas na capa dos esporos (HUANG et al., 2010; OLIVEIRA-NASCIMENTO et al., 2012; SONG et al., 2012). Tanto os esporos vivos quanto os inativados por autoclavação foram capazes de aumentar a resposta imune humoral e celular contra os antígenos, de origem bacteriana ou viral, adsorvidos na capa dos esporos. Estes trabalhos também indicam que os esporos são adjuvantes capazes de induzir um perfil de resposta Th1/Th2 balanceado. Entretanto os mecanismos envolvidos com esta adjuvantividade ainda não foram elucidados.

Para a investigação das propriedades adjuvantes dos esporos, é necessário trabalhar com uma preparação de esporos pura, livre de células vegetativas, uma vez que se tornaria inviável analisar a modulação da resposta imune pelos esporos com uma preparação contaminada com células viáveis ou inativadas, ou até mesmo fragmentos celulares, visto que eles também podem interagir com as células do sistema imune. Por conseguinte, a produção de esporos altamente purificados e com um elevado rendimento representa um processo essencial para o uso desta partícula em aplicações biotecnológicas (TAVARES et al., 2013).

1.3 Produção e purificação de esporos de *B. subtilis*

A produção e purificação de esporos de *B. subtilis*, assim como de outras espécies do gênero *Bacillus*, envolvem duas etapas principais. A primeira consiste na geração de uma boa quantidade de esporos, o que só é possível com a utilização

de meios de cultura e de condições específicas para o cultivo da linhagem. O segundo passo engloba os procedimentos de purificação que separam os esporos das células vegetativas e dos fragmentos celulares (TAVARES et al., 2013).

Os procedimentos para a geração de esporos envolvem a utilização de meios especiais capazes de promover a esporulação em culturas bacterianas. Sabe-se que a esporulação pode ser induzida pela carência de nutrientes, sendo que fontes de carbono, nitrogênio e fósforo são os substratos mais relevantes deste processo. A carência de nutrientes é obtida pela exaustão natural do meio de cultura ou pela transferência das células para um meio de cultura de esporulação, o qual apresenta uma quantidade reduzida de nutrientes (HARROLD; HERTEL; GORMAN-LEWIS, 2011; SONENSHEIN, 2000). Em escala laboratorial, a composição do meio para esporulação difere entre os grupos de pesquisa, variando entre meios quimicamente definidos até meios complexos, sendo que um deles, *Difco Sporulation Medium* (DSM), é amplamente utilizado e disponível comercialmente.

Em relação aos processos de purificação das amostras, uma variedade de técnicas tem sido descritas para separar os esporos das células vegetativas e obter uma fração pura de esporos. Estas técnicas incluem repetidas lavagens com diversas soluções, a fim de remover as células vegetativas; tratamento com desinfetantes para matar as células vegetativas remanescentes sem danificar os esporos; centrifugação por gradiente de densidade, flotação, sonicação, choque térmico, tratamentos enzimáticos e tratamentos utilizando etanol ou acetona (SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2012; ZHAO et al., 2008). Todavia, muitos dos procedimentos descritos fazem uso de técnicas laboriosas, que requerem longo tempo de experimentação ou ferramentas tecnológicas que aumentariam o custo final do produto (HARROLD; HERTEL; GORMAN-LEWIS, 2011; LAFLAMME et al., 2004).

Apesar de diferentes métodos de esporulação e purificação já terem sido propostos para diversas espécies de *Bacillus*, dados quantitativos sobre o rendimento e os níveis de pureza dos esporos obtidos com estas metodologias são pobremente relatados. (DRAGON; RENNIE, 2001; HAGEMAN et al., 1984; MONTEIRO et al., 2005). A despeito da importância da pureza dos esporos para estudos subsequentes, muitos investigadores não conduzem análises para quantificar os níveis de pureza da biomassa final de esporos (HARROLD; HERTEL; GORMAN-LEWIS, 2011). Ademais, trabalhos que comparem, lado a lado, a eficácia

de dois ou mais protocolos para produção e purificação de esporos são praticamente inexistentes.

Estudos que procurem aperfeiçoar os métodos de esporulação e purificação destas amostras serão de extrema relevância para aqueles que trabalham com esporos de *B. subtilis*, pois apenas com uma amostra altamente purificada de esporos será possível estudar sua capacidade de modular a resposta imune contra o antígeno alvo.

1.4 A proteína p24 do HIV-1 como antígeno alvo para estratégias vacinais

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é um retrovírus, pertencente à família do Lentivírus e agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), uma pandemia caracterizada por uma profunda imunossupressão associada a infecções oportunistas, tumores malignos e degeneração do sistema nervoso central (SLEASMAN; GOODENOW, 2003). Entre os dois tipos de HIV (HIV-1 e HIV-2), HIV-1 é mais virulento e responsável por grande parte das infecções globais, as quais corresponderam a, aproximadamente, 2.3 milhões de novos casos no ano de 2012 (UNAIDS, 2013).

A partícula viral possui simetria icosaédrica e apresenta um envelope lipoproteico onde estão inseridas glicoproteínas (gp41, gp120) organizadas em trímeros. O capsídeo viral, formado por monômeros de uma proteína de 24KDa (p24), alberga o genoma do HIV-1 composto constituído por duas fitas simples de RNA. Envolvendo as proteínas do capsídeo encontra-se a matriz proteica formada por monômeros da proteína p27 (Figura 2) (KARLSSON HEDESTAM, 2008).

Figura 2: Representação esquemática do vírus HIV-1. O envelope lipoproteico apresenta complexos triméricos gp120–gp41 embebidos na membrana; A calda citoplasmática proteína transmembrana gp41 interage com a da matriz, a p17. O capsídeo proteico, formado pela p24, forma uma espécie de núcleo que abriga a enzima transcriptase reversa e o genoma do HIV-1, o qual é composto por duas moléculas de RNA fita positiva. Fonte: Modificado de Karlsson Hedestan, 2008.

O genoma do HIV-1 codifica três genes essenciais para a replicação e estrutura viral: Gag, Env e Pol (RUELAS; GREENE, 2013). O gene Env codifica para a glicoproteína gp160, a qual será posteriormente clivada em duas proteínas: a proteína de superfície gp120 e a proteína transmembrana gp41. O gene codifica para as enzimas transcriptase reversa, protease e integrase. O gene Gag codifica para uma poliproteína de 55kDA, a qual, durante a maturação viral, será clivada originando a proteína p17, da matriz proteica, a proteína p24, do capsídeo viral, e a proteína p7 do nucleocapsídeo (CHAKRABORTY; RAHMAN; CHAKRAVORTY, 2014).

A proteína p24 é altamente imunogênica, sendo que a geração de anticorpos capazes de reconhecê-la é um marcador inicial da infecção por HIV e constitui o principal alvo para diagnosticar a infecção nos estágios iniciais (DASKALAKIS, 2011; WESSMAN; THEILGAARD; KATZENSTEIN, 2012). Drogas anti-retrovirais podem reduzir os níveis de p24 circulante e consequentemente este antígeno também pode

ser usado como um marcador para avaliar a eficácia da terapia (BHARDWAJ et al., 2006; SUTTHENT et al., 2003).

Em se tratando de estratégias vacinais contra o HIV, o gene Gag, particularmente o componente p24, é amplamente utilizado como antígeno alvo para indução de uma resposta imune contra o vírus, não só por apresentar sequências altamente preservadas, mas também pela apresentação precoce de peptídeos Gag pelas moléculas de MHC das células infectadas (KORSHOLM, 2013). A proteína p24 possui um importante papel na indução de uma resposta de anticorpos e de células T contra o HIV, por conseguinte, tornou-se componente integral de diversas estratégias vacinais (BOZZACCO et al., 2012; FRENCH et al., 2010; GONG et al., 2009; LIARD et al., 2011).

Neste trabalho utilizamos a proteína Gag-p24 do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) como antígeno modelo para estudar o potencial adjuvante dos esporos. A escolha deste antígeno foi fundamentada na capacidade dos esporos de induzir uma resposta humoral e celular contra o antígeno alvo e na importância de se desenvolver uma vacina contra o HIV capaz de promover a produção de anticorpos, mas também da ativação de respostas celulares específicas, responsáveis pela destruição de células infectadas pelo vírus.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

A presente tese de doutorado tem como objetivo estudar os efeitos adjuvantes dos esporos de *B. subtilis* e os mecanismos envolvidos com esta adjuvantividade.

2.2 Objetivos específicos

- Otimização dos métodos de cultivo e purificação de esporos de *B. subtilis*, com intuito de se obter preparações mais puras e com melhor rendimento;
- Análise da melhor estratégia para o uso de esporos como adjuvante, utilizando a proteína p24 como antígeno modelo, além de estudar detalhes sobre os mecanismos da resposta imune inata e adaptativa que conduzem às propriedades adjuvantes dos esporos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagem bacteriana e condições de crescimento

A linhagem bacteriana utilizada nessa tese foi *B. subtilis* WW02 (*leuA8 metB5 trpC2 hsrdRM1 amyE::neo*), gentilmente cedida pelo Dr. Wolfgang Schumann da Universidade de Bayreuth, Alemanha (WEHRL; NIEDERWEIS; SCHUMANN, 2000). Esta linhagem foi cultivada em meio LB, com a adição do antibiótico Neomicina (25 µg/ml), à 37 °C e em agitação constante.

3.2 Preparação dos esporos

A esporulação das linhagens 1012 WW02 de *B. subtilis* foi realizada em dois diferentes meios, sem adição de antibiótico: 1) meio DSM, composto por 0.8% de meio nutriente Bacto, 0.1% de KCl e 0.025% de MgSO₄. Após a autoclavação, adiciona-se, para cada 1L de meio, 1 ml de Ca(NO₃)₂ 1M, 1 ml de MnCl₂ 10mM e 1ml de FeSO₄ 1mM (NICHOLSON; SETLOW, 1990). 2) meio F, modificado de Foerster e Foster, composto por 1% glicose, 0.1% L-glutamato, 0.05% extrato de levedura, 0.5% KH₂PO₄, 0.1% (NH₄)₃PO₄, 0.02% MgSO₄, 0.01% NaCl, 0.005% CaCl₂, 0.0007% MnSO₄, 0.001% ZnSO₄, 0.001% FeSO₄ (FOERSTER; FOSTER, 1966).

A esporulação em meio líquido foi realizada em frascos de vidro contendo 20 ml de meio de esporulação inoculado com 0,2 ml de uma cultura de *B. subtilis*, cultivada por 16 horas em meio LB. Os frascos foram mantidos a 37 °C e rotação de 200rpm por 24 ou 72 horas, a 37 °C. Já a esporulação em meio sólido foi realizada pelo plaqueamento de 0,2 ml da mesma cultura de *B. subtilis* em uma placa de Petri contendo 1.5% de ágar em 20 ml de meio de esporulação. A incubação ocorreu por 24 ou 72 horas a 37 °C.

3.3 Determinação da frequência de esporulação

Após o período de 24 ou 72 horas de incubação em meio de esporulação, a cultura contendo esporos foi serialmente diluída e plaqueada em meio LB contendo

25 µg/ml de Neomicina, antes e depois do tratamento com calor (65 °C por 1 hora), o qual é capaz de eliminar somente as células vegetativas. A frequência de esporulação, expressa em porcentagem, foi calculada por: (Títulos de esporos depois do tratamento com calor / Títulos de esporos antes do tratamento com calor) x 100.

3.4 Purificação dos esporos

Neste trabalho, nós comparamos dois métodos de purificação de esporos: o método 01, desenvolvido por Nicholson e Setlow, consiste em centrifugação da cultura crescida para remoção do meio (10000 g, 10 min a 4°C), seguida de lavagem com uma solução KCl 1 M e NaCl 0.5 M. Após nova etapa de centrifugação, o precipitado foi ressuspensionado em solução de Tris HCl 50mM (pH 7.2), contendo lisozima a 50 µg/ml, e incubado por 1 hora a 37°C. Os esporos foram limpos por lavagens consecutivas em soluções de NaCl 1 M, água destilada, SDS a 0,05% e tampão TEP (50mM de Tris HCl, pH 7.2; 10 mM de EDTA) finalizadas com três lavagens com água destilada. O método 02 consiste em uma simplificação do primeiro método e baseia-se em centrifugação da cultura crescida para remoção do meio (10000 g, 10 min a 4°C), seguida da incubação por 1 hora a 37°C em solução de Tris HCl 50mM (pH 7.2), contendo lisozima a 50 µg/ml. Os esporos foram limpos por lavagens consecutivas em soluções de SDS 0.05% e água destilada. Depois de purificados, os esporos foram ressuspensionados em água destilada e estocados a uma temperatura de -20 °C.

3.5 Determinação da pureza, do rendimento de recuperação e da eficácia dos métodos de purificação de esporos

Para determinação da pureza das amostras obtidas após a utilização do método 01 ou 02 de purificação, realizou-se uma diluição seriada das amostras e seu plaqueamento em meio LB com 25 µg/ml de Neomicina, antes e depois do tratamento com calor (65 °C por 1 hora). Os valores de pureza, expressos em porcentagem, foram calculados como: (Títulos de esporos purificados, depois do tratamento com calor / Títulos de esporos purificados, antes do tratamento com calor) x 100.

A quantidade de esporos antes e após o tratamento de purificação foi determinada após a diluição seriada das amostras e seu plaqueamento em meio LB com 25 µg/ml de Neomicina, depois do tratamento com calor (65 °C por 1 hora). Já o rendimento de recuperação dos esporos após a purificação foi determinado pela comparação entre o número de esporos recuperados, após a utilização do método 01 ou 02, e o número inicial de esporos na cultura, antes da purificação. Os valores do rendimento, expressos em porcentagem, foram calculados como: (Títulos de esporos no final da purificação / Títulos de esporos antes da purificação) x 100.

A eficácia geral dos métodos de purificação foi calculada como a média aritmética entre os valores de pureza e rendimento de cada procedimento testado.

3.6 Análise das amostras por microscopia

Amostras de 50 µl de cada preparação de esporos foram colocadas em lâminas para microscopia, foram secas naturalmente e analisadas em microscópio de contraste de fase (EVOS fl, AMG, Bothell, Washington, Estados Unidos).

3.7 Adsorção de proteínas na capa do esporo

Os esporos utilizados para adsorção de proteínas foram preparados conforme descrito no trabalho publicado pelo nosso grupo (TAVARES et al., 2013). Suspensões contendo 2×10^9 UFC de esporos foram centrifugadas e ressuspensas em 200 µl de PBS 1x com pH 4, 7 ou 10. A proteína recombinante p24 (24 kDa) foi adicionada à suspensão de esporos, homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 15, 30, 45 ou 60 minutos. Após o período de incubação, a suspensão é centrifugada (10.000 RPM, por 5 minutos à temperatura ambiente), o sobrenadante foi reservado e o precipitado (o qual contém os esporos) foi lavado duas vezes com o mesmo tampão utilizado na adsorção. Para extrair a proteína aderida na capa dos esporos, o precipitado foi fervido por 10 minutos em tampão de amostra (Tris 0.625M, pH 6.8, glicerol 10%, SDS 2% e β-mercaptoetanol 5%, dissolvidos em água destilada) e submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida (15%). O sobrenadante, previamente reservado, foi precipitado adicionando-se TCA na concentração final de 25% e mantido a 0 °C por uma hora, posteriormente, o material foi centrifugado (10 min, 10000 g), o sobrenadante descartado e o

precipitado lavado duas vezes com acetona. Ao término da última etapa de centrifugação, o precipitado final foi ressuspenso em tampão de amostra e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (15%). A proteína p24, gentilmente cedida por membros do laboratório, foi purificada a partir de linhagens recombinantes de *Escherichia coli* (BRAGA et al., 2014).

3.8 Quantificação das proteínas adsorvidas na capa do esporo

As proteínas adsorvidas na capa dos esporos e as proteínas que permaneceram no sobrenadante após o ensaio de adsorção, foram quantificadas pelo método de dot blot. Diluições seriadas das amostras, assim como da proteína p24 purificada (utilizada como parâmetro para quantificação do antígeno) foram aplicadas, sob vácuo, na membrana de nitrocelulose, a qual posteriormente foi bloqueada em solução de 5% de leite desnatado, dissolvido em PBS, por 14 horas a 4°C. A membrana foi submetida a lavagens com PBS-Tween 0,05% e incubações com anticorpos policlonais (anti-p24 na proporção 1:3000) e anticorpos secundários anti-IgG conjugados à peroxidase (Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) na proporção 1:3000. A detecção foi feita com uso de um kit de quimioluminescência (Pierce, Rockford, Illinois, Estados Unidos), seguindo as recomendações do fabricante, e pela exposição a filmes Kodak X-Omat por 30 minutos. A quantificação das amostras foi obtida após a digitalização do filme fotográfico e análise da imagem pelo programa ImageJ, versão 1.47.

3.9 Imunização e processamento das amostras

Os experimentos de imunização foram realizados com camundongos da linhagem C57BL/6, selvagens ou nocautes para MyD88 e TLR2, e camundongos selvagens da linhagem BALB/c, todos com idade entre 6 a 8 semanas, adquiridos do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia e do Departamento de Parasitologia da Universidade de São Paulo. Os camundongos foram manuseados de acordo com as normas estabelecidas pela comissão de ética do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Grupos de 3 a 5 animais foram imunizados com três doses, por via subcutânea (100µl por dose) nos dias 0, 14 e 28. Os camundongos foram inoculados

com PBS 1x pH 7; 700ng de proteína p24 diluída em PBS 1x pH 7; 700ng de p24 misturada com 15µg de Alúmen, diluídos em PBS 1x pH 7; 10 µg de p24 misturada com 1 µg de LT1, diluídos em PBS 1x pH 7; 700 ng de p24 adsorvida na capa de 2×10^9 esporos vivos, diluídos em PBS 1x pH 4; 700 ng de p24 misturada com 2×10^9 de esporos vivos ou autoclavados (121 °C, 30 minutos), diluídos em PBS 1x pH 10; ou com 2×10^9 de esporos vivos ou autoclavados, diluídos em PBS 1x pH 7.

Amostras de soro foram coletadas um dia antes da primeira dose (amostras pré-ímmunes) e nos dias 13, 27 e 41. O sangue foi mantido a temperatura ambiente por 1 hora, depois incubado a 4 °C por mais 1 hora e, por fim, centrifugado a 5.000 rpm, 30 minutos, a 4 °C para obtenção do soro. Este material foi armazenado a -20 °C até o momento do uso. Duas semanas após a última dose, os camundongos foram eutanasiados, os baços foram recolhidos e, posteriormente, macerados para permitir a análise de células do sistema imune.

3.10 Detecção de respostas de anticorpos séricos

Análises das respostas de anticorpos anti-p24 e anti-esporos foram realizadas em placas de ELISA sensibilizadas com a proteína purificada na concentração de 2mg/ml ou com 1×10^8 esporos, ambos em PBS, por 16 horas a 4°C. Uma etapa de bloqueio foi realizada incubando as placas por 90 minutos a 37°C com uma solução 1% de BSA dissolvida em PBS. Após uma etapa de lavagem com PBS contendo 0.05% de Tween 20, as placas foram incubadas com diluições seriadas dos soros em PBS contendo 0.1% de BSA por 1 hora e 30 minutos. Posteriormente, as placas foram lavadas novamente e adicionaram-se anticorpos para detecção de IgG, IgG1, IgG2a ou IgG2c conjugados com peroxidase. Após 1 hora de incubação, as placas foram reveladas com uma solução formada por OPD em tampão fosfato – citrato (pH 5.0) contendo H_2O_2 . A D.O._(492nm) foi mensurada após a reação ser paralisada com Ácido Sulfúrico 1M.

3.11 Ensaio de avidéz dos anticorpos específicos para p24

Análise da avidéz dos anticorpos anti-p24 foi realizada em placas de ELISA sensibilizadas com a proteína purificada na concentração de 2mg/ml, por 16 horas a 4 °C. Uma etapa de bloqueio foi realizada incubando as placas durante 90 minutos a

37 °C com uma solução 1% de BSA dissolvida em PBS. Após uma etapa de lavagem com PBS contendo 0,05% de Tween 20, 100 µl dos *pools* dos soros de cada grupo de imunização (normalizados na D.O. 1 ou 0,5) foram adicionados aos poços e incubados a temperatura ambiente por 90 minutos. Depois de um novo ciclo de lavagem (3x), foram adicionados 100 µl tiocianato de amônio diluído em PBS 1X (concentração de 0 a 8M) e as placas foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas novamente e o anticorpo para detecção de IgG, conjugado com peroxidase, foi adicionado. Após incubação por 90 minutos, as placas foram reveladas com uma solução formada por OPD em tampão fosfato – citrato (pH 5) contendo H₂O₂. A D.O._(492nm) foi mensurada após a reação ser paralisada com Ácido Sulfúrico 1M. A concentração de tiocianato de amônio necessária para dissociar 50% da ligação do anticorpo ao antígeno será determinada da seguinte forma: $D.O._{(492nm)} \text{ em presença de tiocianato de amônio} \times 100 / D.O._{(492nm)} \text{ em ausência de tiocianato de amônio}$.

3.12 Determinação das respostas de linfócitos T CD4+ e TCD8+

Suspensões de células obtidas por meio de baços macerados foram tratadas com cloreto de amônio e potássio (tampão ACK), para lisar os eritrócitos, posteriormente centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino. Em seguida, as células foram estimuladas, por 16 horas, com peptídeos sintéticos (GenScript, Piscataway, New Jersey, Estados Unidos) correspondentes a epítomos CD4 (AMQMLKETINEEAAE,) ou CD8 (AMQMLKETI) da proteína p24; ou por 72 horas com a proteína p24 purificada. A incubação ocorreu a 37 °C em uma atmosfera contendo 5% de CO₂. Após este período, anticorpos anti-CD8 conjugado a FITC e anti-CD4 conjugado a Cy (BD Biociences, BD Bioscience, San Jose, Califórnia, Estados Unidos) foram incubados com as células por 30 minutos a 4 °C. Para a marcação intracelular com anticorpos anti-IFN-γ e anti-IL-4, ambos conjugados a PE (BD Biociences), as células foram fixadas com paraformaldeído e permeabilizadas com saponina. A fluorescência foi medida usando o citometro de fluxo FACSCalibur™ (BD Biociences) e a análise de dados foi efetuada por meio do software FlowJo FACS data analysis (Tree Starreet, Ashland, Oregon, Estados Unidos).

3.13 Análise histológica dos linfonodos

Um dia após o término do protocolo vacinal, os animais foram eutanasiados e os linfonodos inguinais foram cirurgicamente removidos. Os procedimentos de microtomia dos linfonodos, a confecção das lâminas e a coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) foram realizados em outro laboratório, especializado em manipulação de amostras histológicas. As lâminas foram analisadas em um microscópio de contraste de fase (EVOS fl, AMG, Bothell, Washington, Estados Unidos).

3.14 Hemograma dos camundongos imunizados

Um dia após o término do protocolo vacinal, animais foram sangrados e as amostras de soro foram submetidas a contagem de células sanguíneas. Foram analisados cinco parâmetros hematológicos: leucócitos (LEU), monócitos (MON), linfócitos (LIN), neutrófilos (NEU) e eosinófilos (EOS). A contagem de leucócitos foi realizada em uma câmara de Neubauer e os outros tipos celulares foram quantificados usando um microscópio de contraste de fase (Eclipse E200, Nikon, Chiyoda-ku, Tóquio, Japão).

3.15 Monitoramento de marcadores bioquímicos para reações inflamatórias

Um dia após a última dose, animais foram sangrados e as amostras de soro foram submetidas a testes para determinação dos níveis de lactato desidrogenase (Larborclin, Pinhais, Paraná, Brasil) e proteína C reativa (Bioclin, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), conforme as especificações dos fabricantes.

3.16 Diferenciação *in vitro* de células dendríticas a partir da medula óssea de camundongos

Células dendríticas foram preparadas de acordo com protocolo descrito anteriormente (MARIM et al., 2010; ZANONI et al., 2009). Para obtenção dos fêmures, camundongos da linhagem C57BL/6 foram eutanasiados e depois pulverizados com etanol 70%. Os fêmures foram dissecados por meio de cortes abaixo das articulações do joelho e no fim do osso pélvico. Após a remoção dos

músculos ligados ao osso com gaze limpa, os fêmures coletados foram colocados em um recipiente contendo PBS estéril. Posteriormente, os ossos foram esterilizados com etanol 70%, as epífises cortadas e o interior do osso lavado com PBS estéril para retirar a medula óssea. A suspensão de células obtidas foi colocada em placas de Petri sem tratamento para cultura celular e cultivadas com 10 ml de meio condicionado (RPMI-1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 100U/ml de Penicilina/Estreptomicina, 4% de aminoácidos não essenciais, 90 μ M β -mercaptoetanol, 30 ng/mL de GM-CSF murinho e 10 ng/mL de IL-4), a 37°C em uma atmosfera contendo 5% de CO₂ por 4 dias. No quarto dia, retirou-se o sobrenadante do meio de cultura, adicionou-se mais 10 ml de meio condicionado pré-aquecido e as células foram cultivadas por mais 4-5 dias. Após o processo de diferenciação, as células dendríticas foram coletadas da placa e lavadas com PBS antes de serem utilizadas nos ensaios.

3.17 Incubação de células dendríticas com esporos de *B. subtilis*

Em uma placa de cultura celular de 12 poços, as células dendríticas diferenciadas a partir da medula óssea foram adicionadas na concentração de 2×10^6 células por poço. Cada poço continha também 500 μ l de RPMI-1640, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino. Após 18 horas de incubação a 37°C em 5% de CO₂, o sobrenadante da cultura celular foi retirado e adicionou-se 500 μ l de RPMI-1640 pré-aquecido. Em seguida foram adicionados 100 μ l de PBS estéril, 100 μ l PBS contendo esporos vivos ou 100 μ l PBS contendo esporos inativados por autoclavação, na proporção de 10.000 esporos para célula. Após 24 horas de incubação, tanto as células quanto o sobrenadante da cultura foram analisados para verificar se as células dendríticas são ativadas após a estimulação com os esporos.

3.18 Análise das amostras por ELISA de citocinas

Placas para realização de imunoensaios (BD Biosciences) foram sensibilizadas, por 12 horas, com o anticorpo de captura em tampão específico. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS 1x contendo 0,05% de Tween 20 e o sobrenadante da cultura de células dendríticas, as quais foram estimuladas com os esporos, foi adicionado em alguns poços da placa, enquanto em outros foi

adicionado o padrão para a citocina recombinante. Após 12 horas de incubação, as placas foram lavadas e sensibilizadas com anticorpo de detecção (biotinilado) em PBS 1x + 1% BSA, por 60 min. As placas foram então lavadas e incubadas por 60 minutos com o conjugado (estreptavidina-peroxidase) diluído em PBS 1x + 1% BSA. Posteriormente, as placas foram lavadas e o substrato TMB (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) foi adicionado. A D.O._(450nm) foi mensurada após a reação ser paralisada com Ácido Sulfúrico 1M.

3.19 Análise das amostras por citometria de fluxo

Para a análise de citometria de fluxo, as células dendríticas foram recolhidas e incubadas, por 30 min a 4 °C, com os anticorpos anti-CD11c conjugado com PE, anti-CD40 conjugado com APC e anti-MHC de classe I ou anti-MHC II, ambos conjugados com FITC (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, Califórnia, Estados Unidos). Depois de três passos de lavagem, as células foram ressuspensas em PBS e as amostras foram examinadas por citometria de fluxo utilizando o aparelho FACSCalibur™ (BD Biosciences). Sessenta mil eventos foram adquiridos através do citometro de fluxo e os dados foram analisados usando o software FlowJo para a determinação, primeiramente, das células positivas para CD11c e, em seguida, análise da expressão de moléculas coestimulatórias por estas células.

3.20 Análises estatísticas

A significância estatística ($p < 0.05$) foi determinada utilizando análise de variância (two-way ANOVA), seguida do teste de Bonferroni (Bonferroni posttest). Os dados sobre MFI foram analisados pelo teste t de Student. As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5, e foram expressas como a média $\pm$ SEM ou média $\pm$ SD.

4 RESULTADOS

4.1 Capítulo I - Otimização das condições de cultivo e dos métodos de purificação para produção de esporos de *B. subtilis*

No trabalho apresentado neste capítulo, nós realizamos uma análise comparativa entre diferentes condições de cultivo e procedimentos de purificação de esporos com intuito de verificar qual metodologia seria mais eficiente. O estudo envolveu o crescimento da linhagem laboratorial WW02 de *B. subtilis* em dois meios de esporulação (DSM e meio F), sendo que o estado físico do meio e o tempo de cultivo também foram avaliados. Por fim, testamos dois métodos de purificação de esporos, um amplamente usado pelos grupos de pesquisa e outro, desenvolvido pelo nosso grupo, que consiste em um procedimento mais simplificado, baseado na incubação dos esporos apenas com lisozima e detergente.

4.1.1 Efeito das condições de cultivo na esporulação de *B. subtilis*

Inicialmente, determinamos a quantidade de esporos encontrada após o cultivo da linhagem WW02 de *B. subtilis* em dois diferentes meios de esporulação (DSM e F), em dois tempos de incubação (24 ou 72 horas) e em duas condições de cultivo distintas (meio líquido ou sólido). A frequência de esporulação da linhagem de *B. subtilis* foi determinada como a relação entre a quantidade de esporos viáveis e o número total de células viáveis (esporos e células vegetativas) presentes na cultura, após o período de incubação em meio de esporulação.

A frequência de esporos após o cultivo em meio DSM líquido variou de 15.1% (6.7×10^8 UFC/ml), após 72 horas de incubação, até 45.5 % (4×10^8 UFC/ml), após 24 horas de incubação. Já as amostras esporuladas em placa atingiram, no máximo, a frequência de esporulação de 35.9% (10^8 UFC/ml) após 72 horas de incubação (Figura 3).

Figura 3: Frequência de esporulação da linhagem WW02 de *B. subtilis* cultivada em meio DSM. Os valores das colunas representam a frequência de esporulação em porcentagem, e o símbolo (Δ) representa o número total de esporos viáveis. Os dados mostrados na figura representam a média de três experimentos independentes $\pm$ desvio padrão.

A esporulação feita em meio F mostrou-se mais dependente do tempo de incubação. A frequência de esporulação em meio F líquido variou de 13.2% (6.5×10^6 UFC/ml), após 24 horas de incubação, até 74.2 % (1.2×10^9 UFC/ml), após 72 horas de incubação. Já as amostras esporuladas em placa atingiram, no máximo, a frequência de esporulação de 48.8% (9.5×10^6 UFC/ml) após 72 horas de incubação (Figura 4). Estes resultados indicam que, para a linhagem WW02, a maior frequência de esporulação e a maior concentração absoluta de esporos são obtidas utilizando-se o meio de esporulação F, após 72 horas de incubação.

Figura 4: Frequência de esporulação da linhagem WW02 de *B. subtilis* cultivada em meio F. Os valores das barras representam a frequência de esporulação em porcentagem, e o símbolo (Δ) representa o número total de esporos viáveis. Os dados mostrados na figura representam a média de três experimentos independentes $\pm$ desvio padrão.

4.1.2 Determinação da pureza dos esporos após a utilização de diferentes métodos de purificação

Com intuito de aprimorar e simplificar o procedimento para purificar os esporos, realizamos a comparação entre dois métodos de purificação: método 1, descrito por Nicholson e Setlow, o qual é amplamente utilizado pela comunidade científica; método 02, que consiste um procedimento mais simplificado que inclui um tratamento com lisozima e SDS. A porcentagem de pureza dos esporos foi determinada como a relação entre a quantidade de esporos viáveis e o número total de células viáveis (esporos e células vegetativas) presentes na suspensão após o tratamento com o método 01 ou 02.

A pureza dos esporos obtida com o uso do método 01 variou de 47.1% (culturas preparadas em meio F por 24 horas) até 90% (culturas preparadas em meio DSM por 24 ou 72 horas). Em contrapartida, o tratamento com o método 02 resultou em amostras altamente purificadas para todas as condições de cultivo, com valores entre 93.5% (culturas preparadas em meio DSM por 24 horas) e 99.1% (culturas preparadas em meio F por 72 horas) (Figura 5). Estes resultados indicam

que a purificação dos esporos pode ser aprimorada apenas com o uso de uma variação simplificada do método de purificação descrito por Nicholson e Setlow.

Figura 5: Avaliação da pureza dos esporos após a aplicação dos métodos de purificação. As bactérias foram esporuladas por 24 ou 72 horas em meio DSM ou F e purificadas pelo método 01 (colunas pretas) ou método 02 (colunas brancas). Os dados mostrados na figura representam a média de três experimentos independentes, feitos em duplicata, $\pm$ desvio padrão.

É válido ressaltar que os experimentos acima foram realizados em amostras esporuladas em meio líquido, visto que as culturas preparadas em meio sólido mostraram resultados drasticamente diferentes, com baixos rendimentos e alta contaminação com células vegetativas, as quais formaram aglomerados difíceis de solubilizar durante o processo de purificação.

4.1.3 Determinação do rendimento de esporos e da eficácia geral dos procedimentos de purificação

Nesta etapa do trabalho, realizamos uma comparação entre os dois métodos de purificação em relação à quantidade final de esporos obtida após o tratamento. A quantidade de esporos viáveis, após a aplicação do método 01, variou entre 2.7×10^5 até 8×10^8 UFC/ml. Por outro lado, a aplicação do método 02 resultou em valores

acima de 10^9 UFC/ml em duas condições de cultivo: meio DSM por 24 horas e meio F por 72 horas (Figura 6).

Figura 6: Avaliação do rendimento total de esporos após a aplicação dos métodos de purificação. As bactérias foram esporuladas por 24 ou 72 horas em meio DSM ou F e purificadas pelo método 01 (colunas pretas) ou método 02 (colunas cinzas). A coluna branca mostra a quantidade de esporos antes da purificação. Os dados mostrados na figura representam a média de três experimentos independentes, feitos em duplicata, $\pm$ desvio padrão. ** $p < 0.001$.

O rendimento de recuperação de esporos após os tratamentos purificação foi determinado como a relação entre a quantidade de esporos viáveis, após o uso do método 01 ou 02, e o número inicial de esporos antes do tratamento. A aplicação do método 01 resultou numa recuperação de 0.1 a 32% do número inicial de esporos. Por outro lado, a aplicação do método 02 resultou em 100% de recuperação em culturas cultivadas meio DSM por 24 horas e meio F por 72 horas (Tabela 2).

Com base na pureza e no rendimento obtido com as diferentes condições testadas, determinou-se a eficácia geral dos dois métodos de purificação para a linhagem WW02 de *B. subtilis* após sua esporulação em meio F ou DSM. A tabela 2

mostra que a eficácia do método 01 variou entre 23.6 a 60.5%, enquanto a eficácia do método 02 variou entre 50.9 até 99.6%. De modo geral, os melhores resultados foram obtidos com a utilização do método 02, particularmente em amostras cultivadas em meio F e DSM, por 72 e 24 horas, respectivamente.

Tabela 2: Comparação entre os métodos de purificação de esporos de *B. subtilis*.

Meio de Esporulação	Incubação (h)	Frequência de Esporulação (%)	Pureza (%)		Rendimento (%)		Eficácia (%)	
			Método		Método		Método	
			01	02	01	02	01	02
DSM	24	45.5	89	93.5	32	100	60.5	96.7
	72	15.1	87.9	97.7	3.6	4.7	45.7	51.2
F	24	13.2	47.1	95.6	0.14	6.1	23.6	50.9
	72	74.2	82.4	99.1	0.7	100	41.5	99.6

4.1.4 Avaliação microscópica das amostras purificadas

Com intuito de comparar a eficácia dos dois métodos quanto à eliminação de células vegetativas mortas e fragmentos celulares, amostras de esporos, purificados após o cultivo em meio F líquido por 72 horas, foram analisadas por meio de microscopia de contraste de fase. Antes da aplicação de algum procedimento de purificação, as preparações de esporos também exibem um grande número de células vegetativas (Figura 7A). Amostras submetidas aos métodos 01 ou 02 de purificação não exibem células vegetativas, todavia, fragmentos celulares foram observados em amostras purificadas pelo método 01 (Figura 7B); ao contrário do método 02 que não apresentou debris celulares (Figura 7C). Estes resultados demonstram que o método 02 de purificação é capaz de eliminar células vegetativas e fragmentos celulares e, concomitantemente, reduzir a carga de trabalho e o tempo dispendido para realizar esta tarefa.

Figura 7: Exame microscópico da preparação de esporos após aplicação de diferentes métodos de purificação. Todas as amostras foram esporuladas em meio F líquido por 72 horas a 37 °C. A) Amostras antes do processo de purificação. B) Esporos purificados pelo método 01. C) Esporos purificados pelo método 02. Aumento: 600x. O detalhe no canto direito superior de cada imagem corresponde a uma amplificação de 5x.

Em suma, estes dados demonstram que a purificação dos esporos da linhagem WW02 de *B. subtilis* pode ser significativamente melhorada por meio de simples ajustes nas condições de crescimento e na metodologia de purificação, resultando em amostras mais puras e de maior rendimento.

4.2 Capítulo II - Adjuvanticidade dos esporos de *B. subtilis*

Neste capítulo descreveremos uma série de experimentos visando avaliar a capacidade dos esporos de influenciar na magnitude e diversidade da resposta imune contra um antígeno alvo. Para isso, utilizaremos a proteína recombinante p24, componente do capsídeo viral do HIV, como antígeno vacinal.

4.2.1 Adsorção da proteína p24 na capa dos esporos

Para analisar o efeito adjuvante dos esporos da linhagem *B. subtilis* WW02, utilizamos duas estratégias: na primeira, uma quantidade fixa de esporos é simplesmente misturada a uma determinada quantidade de proteína alvo e depois administrada nos animais. Na segunda abordagem, a proteína alvo é adsorvida na capa do espora e posteriormente esta formulação será administrada.

A adsorção de proteínas na capa do espora é um fenômeno físico-químico que envolve interações eletrostáticas e de hidrofobicidade entre os esporos e o antígeno. A figura 8 mostra a adsorção de 2µg da proteína p24 à capa dos esporos, o quais foram diluídos em tampão PBS 1x com diferentes valores de pH. Após o protocolo de adsorção da proteína na capa dos esporos, estes foram centrifugados, lavados duas vezes com tampão PBS 1x e as proteínas da capa foram extraídas e aplicadas em gel de poliacrilamida.

Figura 8: Adsorção da proteína p24 na capa dos esporos de *B. subtilis*. (1) Controle negativo: esporos de *B. subtilis* sem proteína adsorvida na capa; (2) Controle positivo: 2µg de p24 (24kDa); (3) Proteína adsorvida na capa dos esporos após a incubação em tampão PBS 1x com pH 4; (4) Proteína adsorvida na capa dos esporos após a incubação em tampão PBS 1x com pH 7; (5) Proteína adsorvida na capa dos esporos após a incubação em tampão PBS 1x com pH 10.

Nossos dados mostram que em pH 4 a adsorção da proteína foi mais eficiente que nas outras condições. O ponto isoelétrico da proteína p24 é por volta de 6.87, portanto em solução de pH 4 a proteína adquire uma carga positiva, o que pode estar ajudando na ligação à capa dos esporos, os quais exibem uma carga negativa (o potencial zeta dos esporos em PBS 1x é -20mV).

O uso de PBS 1x com pH 4, apesar de ser a condição mais eficiente para adsorção, não promoveu a total adsorção das 2µg de proteína adicionadas na reação; portanto foi preciso fazer uma análise quantitativa para determinarmos o quanto de proteína estava sendo adsorvida. Utilizamos o ensaio de *Dot-blot* para podermos relacionar a curva padrão da proteína p24, com a quantidade de proteína adsorvida na capa do esporo e a quantidade de proteína que não foi adsorvida e encontrava-se presente no sobrenadante (Figura 9). Por meio de um programa de análise de imagens, ImageJ, foi possível analisar quantitativamente a figura obtida com o ensaio de *Dot-blot* e determinar que 2×10^9 UFC de esporos são capazes de promover a adsorção de 700ng de proteína purificada.

Figura 9: Ensaio de *Dot-blot* utilizado na quantificação do total de proteína adsorvida em 2×10^9 UFC de esporos de *B. subtilis*. A fileira 1 representa a curva padrão da proteína p24, partindo de um valor inicial de 1000ng até chegar a um valor de 7,6ng. A fileira 2 representa a diluição seriada do total de proteínas que permaneceram no sobrenadante após o ensaio de adsorção. A fileira 3 representa a diluição seriada do total de proteínas adsorvidas na capa dos esporos ao final do ensaio de adsorção.

Verificamos também que, se fixarmos a quantidade de esporos (2×10^9 UFC) e aumentarmos gradativamente a concentração da proteína adicionada no início do experimento, a quantidade de proteína adsorvida na capa dos esporos ao final do

ensaio ainda será de 700ng, indicando que este é o valor máximo de proteína que esta quantidade de esporos consegue interagir (Figura 10).

Figura 10: Adsorção de diferentes concentrações de p24 durante o período de 1 hora em solução de PBS 1x com pH 4. O eixo das ordenadas representa a quantidade de proteína que foi adsorvida na capa de 2×10^9 esporos, enquanto o eixo das abscissas mostra a quantidade de proteína presente no início das diferentes reações de adsorção.

Após definirmos qual o melhor valor de pH da solução e a quantidade de proteína de adsorvida nesta condição, realizamos ensaios para verificar se a adsorção é uma reação tempo dependente. A Figura 11 mostra que após 15 minutos de reação já notamos a adsorção das proteínas e que a quantidade adsorvida não varia de acordo com o tempo.

Figura 11: Adsorção da proteína p24 na capa dos esporos de *B. subtilis*, em solução de PBS 1x com pH 4, durante diferentes intervalos de tempo. (1) Controle negativo: esporos de *B. subtilis* sem proteína adsorvida na capa; (2) Proteína adsorvida na capa dos esporos após 15 minutos de incubação; (3) Proteína adsorvida na capa dos esporos após 30 minutos de incubação; (4) Proteína adsorvida na capa dos esporos após 45 minutos de incubação; (5) Proteína adsorvida na capa dos esporos após 60 minutos de incubação.

Determinada a melhor condição de adsorção, verificamos também se a interação esporo-proteína é estável ao longo do tempo e em diferentes condições. Amostras de esporos previamente adsorvidas com a proteína p24 em solução de PBS 1x com pH 4, foram novamente incubadas em solução de PBS 1x com pH 4, pH 7 ou pH 10, durante diferentes intervalos de tempo (15, 30, 45 e 60 minutos), para verificar se a proteína se dissociava do esporo durante essa incubação (Figura 12). Nossos resultados mostram que a interação proteína-esporo é estável, sem perdas significantes por, pelo menos, 60 minutos de incubação.

Figura 12: Estabilidade da ligação da proteína p24 à capa dos esporos de *B. subtilis*. Esporos adsorvidos com a proteína p24 foram ressuspensos em PBS 1x com pH 4, pH 7 ou pH 10 e incubados por 15, 30, 45 e 60 minutos. Nos intervalos de tempo indicados na figura, amostras foram centrifugadas e tanto os precipitados (contendo as proteínas que ficaram adsorvidas na capa do esporo) quanto os sobrenadantes (contendo as proteínas que se dissociaram dos esporos) foram aplicados em gel de poliacrilamida (15%).

4.2.2 Efeito adjuvante das diferentes estratégias na indução de uma resposta humoral contra p24

Estabelecidas as condições ideais de adsorção, realizamos ensaios *in vivo* para verificar o efeito adjuvante dos esporos na indução de uma resposta específica contra p24. Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram imunizados por via subcutânea de acordo com os grupos descritos na tabela 3. Para ser possível a comparação

entre as duas estratégias (proteína adsorvida e proteína misturada aos esporos), fixamos a mesma quantidade de esporos (2×10^9 UFC) e a dose de p24 utilizada nos ensaios foi de 700ng, a mesma quantidade que foi possível de ser adsorvida em 2×10^9 esporos. A mistura da p24 com os esporos foi efetuada em pH 10 (condição que promoveu os piores valores de adsorção) e a inoculação nos animais foi efetuada imediatamente após a mistura, para diminuir a interação entre a proteína e os esporos e, por conseguinte, a adsorção desta proteína na capa dos mesmos.

Tabela 3 – Descrição da composição de cada dose recebida pelos diferentes grupos de imunização.

Grupo*	Descrição
PBS	PBS 1x
Esporos	2×10^9 UFC de esporos
p24	700ng de p24
p24 misturada ao Alúmen**	700ng de p24 misturada a Hidróxido de Alumínio
p24 misturada aos Esporos	700ng de p24 misturada com 2×10^9 UFC de esporos
p24 adsorvida aos Esporos	700ng de p24 adsorvida na capa de 2×10^9 esporos

*Cada grupo contém cinco animais.

** Utilizado como um adjuvante controle.

Os resultados da resposta de IgG sérico específico para a proteína p24, encontrados após a imunização, estão apresentados a seguir. Os dados demonstram que ao se misturar os esporos com a proteína alvo, verifica-se um aumento significativo dos títulos de anticorpos específicos para p24, principalmente após a 3ª dose. Entretanto, este aumento não foi observado na formulação que emprega a proteína adsorvida na capa do esporo, cujos valores foram semelhantes àqueles apresentados pelo grupo que recebeu apenas a proteína. É válido que ressaltar que os resultados encontrados na imunização dos animais BALB/c (Figura 13) e C57BL/6 (Figura 14) foram bastante semelhantes, o que indica que o efeito adjuvante dos esporos não é afetado pelas diferenças genéticas entre as linhagens de camundongos.

Figura 13: Indução da produção de anticorpos séricos (IgG) contra p24 em camundongos BALB/c imunizados pela via subcutânea. Os resultados estão apresentados na forma de títulos de IgG específicos contra p24 detectados após a 1ª, 2ª e 3ª dose, sendo que os valores de títulos encontrados no grupo PBS foram descontados dos valores medidos nos animais vacinados. Os dados mostram a média de três experimentos $\pm$ erro padrão. *** $p < 0.001$ quando comparados com o grupo de animais que recebeu p24.

Figura 14: Indução da produção de anticorpos séricos (IgG) contra p24 em camundongos C57BL/6 imunizados pela via subcutânea. Os resultados estão apresentados na forma de títulos de IgG específicos contra p24 detectados após a 1ª, 2ª e 3ª dose, sendo que os valores de títulos encontrados no grupo PBS foram descontados dos valores medidos nos animais vacinados. Os dados mostram a média de três experimentos $\pm$ erro padrão. *** $p < 0.001$ quando comparados com o grupo de animais que recebeu p24.

Para tentarmos compreender a diferença de resultados entre as estratégias que misturam e adsorvem a proteína aos esporos, resolvemos verificar se os camundongos imunizados conseguiram gerar uma resposta específica contra os esporos e se esta resposta pode estar contribuindo para a diferença observada em relação ao efeito adjuvante.

Os resultados da resposta de IgG sérico contra os esporos estão apresentados a seguir. Podemos observar que uma resposta específica contra os esporos é desenvolvida, tanto para camundongos BALB/c (Figura 15) quanto para C57BL/6 (Figura 16). Entretanto não há diferenças entre os grupos de imunização, os quais apresentaram praticamente os mesmos valores de títulos de IgG anti-esporos.

Figura 15: Indução da produção de anticorpos séricos (IgG) contra esporos em camundongos BALB/c imunizados pela via subcutânea. Os resultados estão apresentados na forma de títulos de IgG específicos contra esporos detectados após a 1^a, 2^a e 3^a dose, sendo que os valores de títulos encontrados no grupo PBS foram descontados dos valores medidos nos animais vacinados. Os dados mostram a média de três experimentos $\pm$ erro padrão.

Figura 16: Indução da produção de anticorpos séricos (IgG) contra esporos em camundongos C57BL/6 imunizados pela via subcutânea. Os resultados estão apresentados na forma de títulos de IgG específicos contra esporos detectados após a 1^a, 2^a e 3^a dose, sendo que os valores de títulos encontrados no grupo PBS foram descontados dos valores medidos nos animais vacinados. Os dados mostram a média de três experimentos $\pm$ erro padrão

Esses resultados sugerem que a resposta anti-esporo não está relacionada com as diferenças encontradas no efeito adjuvante dos esporos quando a proteína p24 está misturada ou adsorvida. Isto nos leva a crer que a estratégia de adsorção de proteínas simplesmente não favorece o efeito adjuvante dos esporos no desenvolvimento de uma resposta imune humoral contra a proteína p24. Em vista disso, para as próximas etapas deste trabalho, utilizou-se apenas a metodologia que emprega a coadministração da proteína com os esporos.

4.2.3 Comparação do efeito adjuvante dos esporos vivos com os esporos inativados por calor

Para averiguarmos se esporos de *B. subtilis* inativados por autoclavação também são capazes de modular o sistema imune do hospedeiro, camundongos BALB/C e C57BL/6 foram imunizados, por via subcutânea, conforme os grupos descritos na tabela 4.

Tabela 4 – Descrição da composição de cada dose recebida pelos diferentes grupos de imunização.

Grupo*	Descrição
PBS	PBS 1x
Esporos	2×10^9 UFC de esporos
Esporos inativados por calor	2×10^9 UFC de esporos autoclavados
p24	700ng de p24
p24 misturada ao Alúmen**	700ng de p24 misturada a Hidróxido de Alumínio
p24 misturada aos Esporos	700ng de p24 misturada com 2×10^9 UFC de esporos
p24 misturada aos Esporos inativados por calor	700ng de p24 misturada com 2×10^9 UFC de esporos autoclavados

*Cada grupo contém cinco animais.

** Utilizado como um adjuvante controle.

Os resultados da resposta de IgG sérico específico para a proteína p24, encontrados após a imunização, estão apresentados a seguir. Os dados demonstram que as estratégias empregando esporos vivos ou inativados induzem um aumento similar na resposta de anticorpos contra a proteína alvo, demonstrando que o efeito adjuvante não é dependente da germinação dos esporos. É válido que ressaltar que os resultados encontrados na imunização dos camundongos BALB/C (Figura 17) e C57BL/6 (Figura 18) foram bastante semelhantes, indicando que o efeito adjuvante dos esporos vivos ou inativados não é afetado pelas diferenças genéticas entre as linhagens.

Figura 17: Resposta de anticorpos séricos (IgG) contra p24 em camundongos BALB/c imunizados com esporos vivos ou inativados pela via subcutânea. Os resultados estão apresentados na forma de títulos de IgG específicos contra p24 detectados após a 1ª, 2ª e 3ª dose, sendo que os valores de títulos encontrados no grupo PBS foram descontados dos valores medidos nos animais vacinados. Os dados mostram a média de três experimentos $\pm$ erro padrão. *** $p < 0.001$ quando comparados com o grupo de animais que recebeu p24.

Figura 18: Resposta de anticorpos séricos (IgG) contra p24 em camundongos C57BL/6 imunizados com esporos vivos ou inativados pela via subcutânea. Os resultados estão apresentados na forma de títulos de IgG específicos contra p24 detectados após a 1ª, 2ª e 3ª dose, sendo que os valores de títulos encontrados no grupo PBS foram descontados dos valores medidos nos animais vacinados. Os dados mostram a média de três experimentos $\pm$ erro padrão. *** $p < 0.001$ quando comparados com o grupo de animais que recebeu p24.

Em seguida, determinamos a avides dos anticorpos específicos contra o antígeno vacinal, visto que anticorpos com maior avides apresentam uma maior interação antígeno-anticorpo. A concentração de tiocianato de amônio necessária para dissociar 50% dos anticorpos ligados à proteína p24 foi semelhante em todos os grupos de imunização; aproximadamente 1M de tiocianato de amônio (Figura 19 e 20). Portanto, nossos resultados sugerem que a presença dos adjuvantes não alterou de forma significativa a avides dos anticorpos gerados.

Figura 19: Determinação da avides dos anticorpos específicos contra o antígeno p24, gerados em camundongos BALB/c. A proteína p24 foi usada como antígeno de fase sólida e os soros usados foram normalizados para uma absorbância de 1 ($D.O_{492nm}$). Os soros (3ª dose), obtidos com a imunização de camundongos BALB/c, foram normalizados para a realização do ensaio.

Figura 20: Determinação da avididade dos anticorpos específicos contra o antígeno p24, gerados em camundongos C57BL/6. A proteína p24 foi usada como antígeno de fase sólida e os soros usados foram normalizados para uma absorvância de 1 (D.O._{492nm}). Os soros (3ª dose), obtidos com a imunização de camundongos C57BL/6, foram normalizados para a realização do ensaio.

4.2.4 Avaliação do efeito adjuvante dos esporos vivos e inativados na indução de uma resposta celular contra p24

Para verificarmos se os esporos são capazes de modular a geração de respostas celulares contra a proteína p24, procuramos caracterizar a resposta de células T auxiliaadoras analisando, primeiramente, o perfil da resposta de anticorpos por meio da detecção dos isotipos IgG1, IgG2a e IgG2c. Enquanto a imunização apenas com a p24 induz uma resposta IgG2a ou IgG2c dominante, a coadministração dos esporos vivos ou inativados com a proteína levou a um aumento nos níveis de IgG1, resultando em uma distribuição mais balanceada dos isotipos IgG1 e IgG2a ou IgG2c, o que levaria a uma resposta Th1 e Th2 balanceada (Figuras 21 e 22).

Figura 21: Avaliação da produção de isotipos de IgG específicos para p24 após a imunização de camundongos BALB/c. Amostras coletadas após a 3ª dose foram analisadas e os títulos dos anticorpos IgG1 e IgG2a foram calculados. A razão IgG2a/IgG1 está indicada no topo da figura e os dados mostram a média de três experimentos $\pm$ erro padrão.

Figura 22: Avaliação da produção de isotipos de IgG específicos para p24 após a imunização de camundongos C57BL/6. Amostras coletadas após a 3ª dose foram analisadas e os títulos dos anticorpos IgG1 e IgG2c foram calculados. A razão IgG2c/IgG1 está indicada no topo da figura e os dados mostram a média de três experimentos $\pm$ erro padrão.

Ensaio de citometria de fluxo foram realizados para verificar a ativação de linfócitos T CD8+ e T CD4+ específicos para p24. Neste experimento, esplenócitos oriundos de camundongos BALB/c foram estimulados *in vitro* com o peptídeo sintético da p24, enquanto esplenócitos de camundongos C57BL/6 foram estimulados apenas com a proteína, visto que o peptídeo disponível no laboratório é para o haplótipo de camundongos BALB/c (H2[d]). Camundongos foram imunizados por via subcutânea conforme os grupos descritos na tabela 5. Experimentos prévios mostraram que a imunização de camundongos com a proteína p24 misturada ao Alúmen não foi capaz de induzir um efeito adjuvante nas respostas celulares, portanto incluímos um novo grupo controle (p24 misturada a LT1), pois a toxina termo lábil do tipo 1 (LT1), produzida por *Escherichia coli* enterotoxigênica, apresenta um significativo efeito adjuvante na geração de respostas de linfócitos T quando coadministrada, por via subcutânea, com antígenos solúveis (BRAGA et al., 2014).

Tabela 5 – Descrição da composição de cada dose recebida pelos diferentes grupos de imunização.

Grupo*	Descrição
PBS	PBS 1x
p24	700ng de p24
p24 misturada a LT1**	10µg de p24 misturada com 1µg de LT1
p24 misturada aos Esporos	700ng de p24 misturada com 2x10 ⁹ UFC de esporos
p24 misturada aos Esporos inativados por calor	700ng de p24 misturada com 2x10 ⁹ UFC de esporos autoclavados

*Cada grupo contém cinco animais.

** Utilizado como um adjuvante controle.

Verificamos que a coadministração de esporos vivos ou esporos inativados foi capaz de ativar linfócitos T CD4+ produtores de IFN-γ específicos para a proteína p24, com valores entre 2.6% e 3% para camundongos BALB/c (Figura 23) e valores entre 2.9% e 3.5% para camundongos C57BL/6 (Figura 24).

Figura 23: Ativação de linfócitos T CD4+ produtores de IFN-γ específicos para p24, após 16 horas de estimulação *in vitro* dos esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados. Os resultados estão apresentados na forma de porcentagem de células ativadas sobre população total de linfócitos T CD4+ (100.000 células). A frequência de células TCD4+ produtoras IFN-γ em camundongos imunizados com PBS ficou abaixo de 0,6%. As amostras utilizadas no experimento foram coletas no dia 41 após a primeira imunização e analisadas em citometria de fluxo.

Figura 24: Ativação de linfócitos T CD4+ produtores de IFN-γ específicos para p24, após 72 horas de estimulação *in vitro* dos esplenócitos de camundongos C57BL/6 imunizados. Os resultados estão apresentados na forma de porcentagem de células ativadas sobre população total de linfócitos T CD4+ (100.000 células). A frequência de células TCD4+ produtoras IFN-γ em camundongos imunizados com PBS ficou abaixo de 1,6%. As amostras utilizadas no experimento foram coletas no dia 41 após a primeira imunização e analisadas em citometria de fluxo.

Nossos dados demonstraram que a coadministração de esporos induziria uma resposta Th1 e Th2 balanceada. Com base nisso, averiguamos se existe a ativação de linfócitos TCD4+ capazes de produzir a citocina IL-4. Os dados demonstram que tanto os esporos vivos quanto os inativados são capazes de ativar

linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-4 específicos para a proteína p24, com valores entre 1.49% e 1.75% para camundongos BALB/c (Figura 25) e valores entre 2.7% e 3.1% para camundongos C57BL/6 (Figura 26).

Figura 25: Ativação de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-4 específicos contra p24, após 16 horas de estimulação *in vitro* dos esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados. Os resultados estão apresentados na forma de porcentagem de células ativadas sobre população total de linfócitos T CD4⁺ (100.000 células). A frequência de células TCD4⁺ produtoras IL-4 em camundongos imunizados com PBS ficou abaixo de 0,6%. As amostras utilizadas no experimento foram coletas no dia 41 após a primeira imunização e analisadas em citometria de fluxo.

Figura 26: Ativação de linfócitos T CD4+ produtores de IL-4 específicos contra p24, após 72 horas de estimulação *in vitro* dos esplenócitos de camundongos C57BL/6 imunizados. Os resultados estão apresentados na forma de porcentagem de células ativadas sobre população total de linfócitos T CD4+ (100.000 células). A frequência de células TCD4+ produtoras IL-4 em camundongos imunizados com PBS ficou abaixo de 1,5%. As amostras utilizadas no experimento foram coletas no dia 41 após a primeira imunização e analisadas em citometria de fluxo.

Por fim, averiguamos se os esporos também são capazes de promover a ativação de linfócitos TCD8+. Os dados mostram que tanto os esporos vivos quanto os inativados são capazes de ativar linfócitos T CD8+ produtores de IFN- γ específicos para a proteína p24, com valores entre 3.5% e 4% para camundongos

BALB/C (Figura 27) e valores entre 4.2% e 4.5% para camundongos C57BL/6 (Figura 28). Em suma, nossos resultados indicam que os esporos de *B. subtilis*, além de induzirem uma resposta humoral, conseguem induzir uma resposta de células T CD4 e T CD8 contra o antígeno alvo.

Figura 27: Ativação de linfócitos T CD8+ produtores de IFN-γ específicos para p24, após 16 horas de estimulação *in vitro* dos esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados. Os resultados estão apresentados na forma de porcentagem de células ativadas sobre população total de linfócitos T CD8+ (100.000 células). A frequência de células TCD8+ produtoras IFN-γ em camundongos imunizados com PBS ficou abaixo de 0,7%. As amostras utilizadas no experimento foram coletas no dia 41 após a primeira imunização e analisadas em citometria de fluxo.

Figura 28: Ativação de linfócitos T CD8+ produtores de IFN-γ específicos para p24, após 72 horas de estimulação *in vitro* dos esplenócitos de camundongos C57BL/6 imunizados. Os resultados estão apresentados na forma de porcentagem de células ativadas sobre população total de linfócitos T CD4+ (100.000 células). A frequência de células TCD8+ produtoras IFN-γ em camundongos imunizados com PBS ficou abaixo de 2,4%. As amostras utilizadas no experimento foram coletas no dia 41 após a primeira imunização e analisadas em citometria de fluxo.

4.2.5 Avaliação da segurança dos esporos de *B. subtilis* como adjuvante vacinal

Ao se estudar um novo adjuvante vacinal para uso em humanos, um dos fatores que precisam ser avaliados é a segurança do adjuvante na via de administração escolhida. Neste trabalho, utilizamos alguns parâmetros para avaliar a segurança dos esporos quando administrados por via subcutânea. Primeiramente, verificamos que a inoculação dos esporos não provoca reações no local da injeção. Analisamos também se existe alguma alteração patológica nos linfonodos inguinais, os quais irão drenar os antígenos imunizados por via subcutânea. Tanto para camundongos BALB/c (Figura 29) quanto para camundongos C57BL/6 (Figura 30) não observamos diferenças entre os linfonodos do grupo controle (imunizado com PBS) do grupo que recebeu esporos vivos ou inativados. O protocolo de imunização utilizado para todas as análises de parâmetros de segurança foi o mesmo usado para avaliação do efeito adjuvante dos esporos.

Figura 29: Corte histológico e coloração HE dos linfonodos inguinais de camundongos BALB/c. Fotomicrografia da borda do linfonodo evidenciando: 1) córtex; 2) medula; 3) cápsula; 4) tecido adiposo. Os animais foram imunizados, por via subcutânea com PBS (A), esporos (B) ou esporos autoclavados (C).

Figura 30: Corte histológico e coloração HE dos linfonodos inguinais de camundongos C57BL/6. Fotomicrografia da borda do linfonodo evidenciando: 1) córtex; 2) medula; 3) cápsula; 4) tecido adiposo. Os animais foram imunizados, por via subcutânea com PBS (A), esporos (B) ou esporos autoclavados (C).

Em seguida, determinamos o perfil hematológico (leucócitos, monócitos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos) dos camundongos após o protocolo de imunização. Como indicado na Tabela 6, não foi observado nenhuma evidência de alterações hematológicas após a administração de esporos por via subcutânea.

Tabela 6: Análise hematológica* dos camundongos imunizados com esporos de *B. subtilis*.

Parâmetros Hematológicos**	Grupos de Imunização					
	BALB/c			C57BL/6		
	PBS	Esp	Espln	PBS	Esp	Espln
LEU	55 ± 31	58 ± 13	40 ± 12	61 ± 11	50 ± 17	58 ± 11
MON	3.8 ± 3	1.3 ± 1.1	1.5 ± 1.4	1.8 ± 0.9	1.6 ± 1.3	0.8 ± 0.4
LIN	54 ± 17	41 ± 9	28 ± 6.3	46 ± 9.3	35 ± 9.1	47 ± 10
NEU	10 ± 2.2	15 ± 4.4	7.1 ± 1.8	7.3 ± 3.1	13 ± 8.6	9.7 ± 1.1
EOS	0.9 ± 0.6	0.6 ± 0.1	3.1 ± 3.2	4.6 ± 1.7	0.2 ± 0.3	1.1 ± 0.7

* Os dados mostram a média de dois experimentos ± erro padrão. Esp: esporos. Espln: esporos inativados.

** Amostras de sangue foram processadas para determinar leucócitos (LEU), monócitos (MON), linfócitos (LIN), neutrófilos (NEU) e eosinófilos (EOS). Todas as contagens são dadas em 10² células/μl.

Por fim, avaliamos a presença de marcadores bioquímicos não específicos de reações inflamatórias. Nos testes para determinação da concentração plasmática da proteína C reativa, observamos a ausência de aglutinação das amostras, o que demonstra que esta proteína não está presente no sangue dos animais imunizados. Analisamos também a presença de lactato desidrogenase (LDH) no soro dos camundongos. Não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo controle e grupo imunizado com esporos, tanto para camundongos BALB/c (Figura 31) quanto para camundongos C57BL/6 (Figura 32). Estes dados indicam que os esporos de *B. subtilis*, durante o regime de imunização por via subcutânea, são seguros para utilização como adjuvante vacinal.

Figura 31: Níveis de lactato desidrogenase (LDH) presentes no soro de camundongos BALB/c. Valores são expressos como unidades/ml de sangue. Dados representam um resultado representativo de dois experimentos realizados independentemente.

Figura 32: Níveis de lactato desidrogenase (LDH) presentes no soro de camundongos C57BL/6. Valores são expressos como unidades/ml de sangue. Dados representam um resultado representativo de dois experimentos realizados independentemente.

4.2.6 Maturação das células dendríticas pelos esporos de *B. subtilis*.

Para determinar se os esporos seriam capazes de induzir a maturação de células apresentadoras de antígeno, células dendríticas diferenciadas *in vitro*, a partir de monócitos retirados dos fêmures de camundongos C57BL/6, foram incubadas com esporos vivos ou esporos inativados por calor e investigadas quanto à sua ativação por meio da expressão de moléculas de superfície e secreção de citocinas. Os níveis de IL-12, TNF- α e IL-1 β , detectados nos sobrenadantes de culturas de células dendríticas, foram significativamente aumentados após o tratamento com os esporos, sendo que os esporos vivos induziram uma maior secreção de IL-12 do que os esporos inativados (Figura 33).

Figura 33: Indução de citocinas pró-inflamatórias depois da estimulação das células dendríticas com esporos vivos ou inativados. Células dendríticas diferenciadas *in vitro* foram tratadas com PBS, esporos vivos ou esporos inativados na proporção de 10.000 esporos para cada célula. Sobrenadantes foram coletados após 24 horas de incubação e a concentração das citocinas IL-1 β , IL12p70 e TNF- α foram quantificadas por ELISA. Os valores encontrados no grupo PBS foram descontados dos valores medidos nos grupos tratados com esporos. Os dados mostram a média de dois experimentos $\pm$ erro padrão.

**p < 0.01.

Análises de citometria de fluxo de células dendríticas tratadas com esporos revelaram um aumento na expressão das moléculas MHC classe I, MHC classe II e da molécula coestimulatória CD40 (Figura 34). Esporos vivos, no entanto, foram mais efetivos na indução da expressão da molécula MHC classe II que os esporos

inativados (Figura 35). Estes resultados indicam que os esporos, principalmente os esporos viáveis, podem induzir a ativação de células dendríticas e a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Figura 34: Expressão de moléculas de superfície pelas células dendríticas CD11c⁺ após a exposição com esporos de *B. subtilis*. Células dendríticas foram tratadas com esporos vivos ou inativados e os níveis de expressão moléculas MHC classe I, MHC classe II e CD40 foram medidos por citometria de fluxo. Histogramas em cinza representam amostras incubadas com PBS e histogramas pretos representam amostras incubadas com esporos. O MFI para ambas as condições é mostrado no canto superior esquerdo de cada histograma.

Figura 35: Comparação gráfica da expressão das moléculas CD40, MHC classe I e MHC classe II. Os dados de MFI mostrados na figura representam a média de dois experimentos $\pm$ erro padrão. * $p < 0.05$ ou ** $p < 0.01$ quando comparados com as amostras tratadas com PBS. Esp: esporos. Espln: esporos inativados.

4.2.7 A importância dos receptores do tipo Toll para o efeito adjuvante dos esporos de *B. subtilis*

Os resultados anteriores mostraram que os esporos interagem com as células dendríticas e são capazes induzir a maturação destas células. Nesta etapa do trabalho, avaliamos se os esporos interagem com receptores de reconhecimento de padrão (neste caso, receptores do tipo Toll) presentes nestas células e, desta forma, sinergicamente potencializam a resposta induzida pela vacina. Primeiramente, analisamos se as vias de sinalização dependentes da proteína adaptadora MyD88 estão relacionadas com o efeito adjuvante dos esporos na resposta humoral contra p24. Camundongos C57BL/6 nocautes para MyD88 foram imunizados por via subcutânea conforme os grupos descritos na tabela 7.

Tabela 7 – Descrição da composição de cada dose recebida pelos diferentes grupos de imunização.

Grupo*	Descrição
PBS	PBS 1x
p24	700ng de p24
p24 misturada ao Alúmen**	700ng de p24 misturada a Hidróxido de Alumínio
p24 misturada aos Esporos	700ng de p24 misturada com 2×10^9 UFC de esporos
p24 misturada aos Esporos inativados por calor	700ng de p24 misturada com 2×10^9 UFC de esporos autoclavados

*Cada grupo contém cinco animais.

** Utilizado como um adjuvante controle.

Os resultados da resposta de IgG sérico específico para a proteína p24, encontrados após a imunização, estão apresentados a seguir. Em camundongos imunizados apenas com a proteína p24, a resposta humoral não foi afetada pela inativação da via de sinalização dependente de MyD88. Entretanto, os animais nocautes para MyD88 não apresentaram um aumento da resposta de anticorpos anti-p24 após a coadministração de esporos vivos ou inativados (Figura 36).

Figura 36: Indução da produção de anticorpos séricos (IgG) contra p24 em camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para MyD88. Os resultados estão apresentados na forma de títulos de IgG específicos contra p24 detectados após a 3ª dose, sendo que os valores de títulos encontrados no grupo PBS foram descontados dos valores medidos nos animais vacinados. Os dados mostram a média de dois experimentos $\pm$ erro padrão. *** $p < 0.001$.

Visto que a via de sinalização dependente de MyD88 está envolvida no efeito adjuvante dos esporos, decidimos determinar qual receptor do tipo Toll tem um papel neste processo. Considerando que as células vegetativas e os esporos de *B. subtilis* conseguem estimular, *in vitro*, a expressão do receptor do tipo Toll 2 pelas células dendríticas (HUANG et al., 2008), nós imunizamos camundongos nocautes para TLR2 com as formulações previamente descritas na tabela 7, para verificarmos se o efeito adjuvante é alterado na ausência deste receptor (Figura 37).

Figura 37: Indução da produção de anticorpos séricos (IgG) contra p24 em camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para TLR2. Os resultados estão apresentados na forma de títulos de IgG específicos contra p24 detectados após a 3ª dose, sendo que os valores de títulos encontrados no grupo PBS foram descontados dos valores medidos nos animais vacinados. Os dados mostram a média de dois experimentos $\pm$ erro padrão. *** $p < 0.001$.

Em camundongos imunizados apenas com a proteína p24, a resposta humoral não foi afetada pela ausência do receptor. Todavia, os animais nocautes para TLR2 não apresentaram um aumento da resposta de anticorpos sistêmicos contra p24 após a coadministração de esporos vivos ou inativados. Estes dados indicam que os esporos interagem com as células dendríticas via TLR2, induzindo a maturação destas células e aumento a resposta imune adaptativa contra o antígeno alvo.

5 DISCUSSÃO

Na presente tese de doutoramento, apresentamos a evolução de conceitos no desenvolvimento de estratégias vacinais que utilizam esporos de *B. subtilis* como adjuvante. Os resultados apresentados englobam a otimização dos métodos de esporulação e purificação dos esporos e a avaliação dos mecanismos imunológicos que conduzem às propriedades adjuvantes desses esporos.

Na primeira parte dos resultados, mostramos uma análise quantitativa e qualitativa das condições de crescimento e procedimentos de purificação visando à geração de uma grande concentração de esporos de *B. subtilis* purificados. Considerando que a presença de células vegetativas nessas preparações podem influenciar as resposta imunológicas aos antígenos coadministrados com os esporos, a produção de amostras puras representa uma etapa primordial para o uso dos esporos como adjuvante vacinal.

O trabalho envolveu a esporulação da linhagem laboratorial WW02 de *B. subtilis* utilizando dois meios de esporulação (DSM e meio F). Além disso, o estado físico do meio (líquido ou sólido) e o tempo de cultivo também foram avaliados. Por fim, após a esporulação da linhagem nesses dois meios, testamos dois métodos de purificação de esporos, um amplamente usado pelos grupos de pesquisa (NICHOLSON; SETLOW, 1990) e outro desenvolvido pelo nosso grupo, o qual consiste em um aperfeiçoamento do método descrito por Nicholson (denominado de Lisozima/SDS), composto por um reduzido número de lavagens, o que diminui o tempo de trabalho e a quantidade de reagentes utilizada no processo.

Os dados demonstraram que a frequência de esporulação é fortemente influenciada pelo meio de cultivo, estado físico e tempo de incubação usado, sendo os melhores resultados encontrados foram com a combinação meio F líquido com crescimento por 72 horas. Com o método Lisozima/SDS obtivemos amostras altamente purificadas, independente das condições de cultivo, e experimentos de microscopia mostraram que estas amostras estão livres de restos celulares.

O meio F apresenta uma quantidade de fontes de carbono e nitrogênio extremamente reduzida ao compararmos com o meio DSM (que apresenta extrato de levedura e peptona em sua composição). Provavelmente a escassez de

nutrientes do meio F contribuiu para que um maior número de células vegetativas esporulasse, portanto mostrou-se mais eficiente que o meio DSM. Com o método Lisozima/SDS, diminuimos drasticamente o número de lavagens efetuadas para a purificação dos esporos, portanto reduzimos a perda de esporos durante a execução do protocolo fazendo com que o rendimento obtido ao final do procedimento fosse maior do que o rendimento obtido com o método Nicholson. Ademais, a incubação apenas com lisozima e detergente mostrou-se eficaz para a eliminação das células vegetativas.

Portanto, com base na eficiência de esporulação, o rendimento e os níveis de pureza, o método de purificação proposto pelo nosso laboratório e descrito nessa tese mostrou-se mais eficaz, aumentando os níveis de recuperação de esporos purificados por meio de uma carga menor de trabalho e sem a necessidade de um biofermentador ou centrifugação de gradiente de densidade. Esse estudo representa uma contribuição importante para aqueles que trabalham com esporos de *B. subtilis* para fins biotecnológicos. É válido ressaltar que esse método de purificação desenvolvido pelo nosso grupo foi empregado para a obtenção dos esporos utilizados nos experimentos que avaliam seu efeito como adjuvante vacinal.

A segunda parte dos resultados, mostramos um estudo mais detalhado da capacidade dos esporos vivos e inativados de interagir com células do sistema imune inato e modular a resposta imunológica contra o antígeno alvo, neste caso, a proteína recombinante p24, principal componente do capsídeo do HIV.

Inicialmente comparamos a efetividade de duas estratégias, já abordadas na literatura: a primeira consiste em adsorver proteínas na capa do esporo enquanto a segunda consiste apenas em coadministrar proteínas e esporos (BARNES et al., 2007; HUANG et al., 2010). Nossos resultados demonstraram que, tanto para camundongos BALB/c quanto para C57BL/6, a simples coadministração dos esporos apresenta um efeito adjuvante significativamente maior do que o efeito provocado pela adsorção da proteína na capa dos esporos, essa última estratégia induz um título de anticorpos específicos para p24 similar ao induzido apenas com a administração da proteína.

Verificamos também que a resposta humoral específica contra os esporos aumenta ao longo do regime de três doses e, estando a proteína adsorvida ou não na capa, a resposta anti-esporo foi similar. Portanto, a ausência do efeito adjuvante observada na estratégia que emprega a adsorção de p24 não está relacionada com

a resposta específica contra os esporos. Ademais, nossos resultados mostram que a capacidade dos esporos de induzir altos títulos de anticorpos contra ele mesmo não reduziu a eficiência em estimular a resposta humoral contra o antígeno.

Embora estudos anteriores demonstrarem que a adsorção de proteínas na capa de esporo é uma estratégia eficaz para aumentar a resposta contra antígenos solúveis, administrados por via de mucosa, não foi possível observar esse efeito com a proteína p24 após a imunização por via parenteral. Com base nisso, apenas a metodologia que emprega a coadministração da proteína com os esporos foi utilizada nas outras etapas do trabalho.

A título de comparação, incluímos um grupo de camundongos imunizado com a proteína p24 misturada ao alúmen, visto que os sais de alumínio são um dos poucos adjuvantes licenciados para uso em humanos. Verificamos que a resposta de anticorpos induzida pelo alúmen é duas ordens de grandeza maior que a resposta induzida quando o esporo é misturado à proteína (tanto para BALB/c quanto para C57BL/6). Entretanto, algumas limitações do Alúmen estão ficando claras com o uso contínuo em humanos: ele não é biodegradável, granulomas são frequentemente observados no local da injeção e este sistema não funciona para algumas proteínas e peptídeos (GUPTA; SIBER, 1995; VOGELBRUCH et al., 2000).

Essas limitações apresentadas pelo alúmen abrem espaço para pesquisa de novos adjuvantes e os esporos surgem como um possível candidato. Durante as imunizações, não observamos a formação de granulomas no local da injeção, trabalhos já publicados mostram o efeito adjuvante dos esporos quando combinado com diferentes proteínas, os esporos não se disseminam substancialmente no organismo após a imunização e, quando germinam, não colonizam os tecidos (HOA et al., 2001). Ademais, os esporos são altamente resistentes à lisozima, proteases, desidratação, antibióticos, solventes e aquecimento até 80°C, características que facilitariam a manipulação e o armazenamento desse adjuvante (DRIKS, 1999).

Observamos também que os esporos inativados por autoclavação são igualmente eficientes em induzir um aumento na resposta humoral contra o antígeno alvo, como os esporos vivos. Isto demonstra que o efeito adjuvante dos esporos não depende da germinação dos mesmos. Ademais o fato dos esporos inativados serem tão eficientes quanto os esporos vivos é uma característica que facilitaria ainda mais a manipulação e o armazenamento deste adjuvante.

O *background* genético das linhagens de camundongos pode afetar o perfil das respostas de células Th induzidas em animais submetidos ao regime de imunização. Camundongos C57BL/6 tipicamente mostram um padrão de resposta imune do tipo Th1, com alta produção de IFN- γ pelos linfócitos T, ao passo que os camundongos BALB/c desenvolvem uma resposta imune que tende para um perfil Th2, com elevada produção de IL-4 (WATANABE et al., 2004). Estudos anteriores demonstraram que os esporos podem induzir uma resposta Th1 e Th2 balanceada (BARNES et al., 2007). Neste trabalho, confirmamos esse comportamento frente ao padrão de resposta imune e, ao contrário das outras publicações, confirmamos essas observações em duas linhagens geneticamente distintas de camundongos.

Primeiramente a imunização com esporos resultou em uma distribuição mais balanceada dos isotipos IgG1 e IgG2a ou IgG2c, indicando a formação a uma resposta Th1 e Th2 balanceada. Esse padrão foi confirmado ao se analisar as respostas celulares, visto que foi possível verificar a ativação de linfócitos T CD4+ antígeno específicos capazes de produzir IL-4 e a ativação de linfócitos T CD4+ e T CD8+, antígeno específicos, capazes de produzir IFN- γ nos camundongos após a imunização com esporos misturados a p24. Coletivamente, esses dados sugerem que esporos, quando administrados por via parenteral, podem induzir tanto uma resposta humoral quanto celular contra o antígeno alvo e que essas respostas independem do *background* genético do hospedeiro. Ademais, com base nos estudos para o desenvolvimento de vacinas seguras e efetivas contra HIV-1, os nossos resultados apontam que os esporos de *B. subtilis* são adjuvantes vacinais promissores, visto que uma vacina contra HIV precisa induzir uma ampla e balanceada resposta de células Th1 e Th2, posto que estudos anteriores apontaram que uma resposta de subclasses de IgG balanceada relaciona-se com a manutenção do status não-progressor da doença (BANERJEE et al., 2010; NGO-GIANG-HUONG et al., 2001).

A estimulação eficaz de linfócitos T requer uma sinalização adequada fornecida por células dendríticas maduras, que consiste no aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias, secreção de citocinas pró-inflamatórias e a apresentação de peptídeos antigênicos ligados a moléculas de MHC (MIYAJI et al., 2011). Nossas análises *in vitro* mostraram que esporos vivos ou inativados pelo calor podem induzir a maturação de células dendríticas. Essa ativação foi medida pelo aumento da secreção de IL-12 e TNF- α , expressão de moléculas de MHC

classe I e II e expressão da molécula co-estimulatória CD40. Embora esporos vivos tenham sido mais eficazes do que esporos inativados na indução da expressão de MHC classe II e na secreção de IL-12, efeito que pode ser atribuído à germinação e a multiplicação de células vegetativas no meio de cultura celular utilizado no ensaio, fenômeno já observado anteriormente (HUANG et al., 2008).

Sabe-se que a ativação de DCs por microrganismos é mediada, predominantemente, por TLRs e a interação desses receptores com moléculas microbianas leva à ativação de uma via de sinalização intracelular, mediada por proteínas adaptadoras, que culmina na maturação das células dendríticas. Nossos resultados mostraram que o efeito adjuvante dos esporos não foi observado em camundongos nocautes para MyD88, evidenciando que as vias de sinalização dependentes da proteína adaptadora MyD88 estão relacionadas com a adjuvanticidade dos esporos. Embora a via dependente de MyD88 seja utilizada pela maioria dos TLRs, nossos resultados fornecem evidências de que adjuvanticidade de esporos de *B. subtilis* resulte do seu reconhecimento pelo receptor TLR2.

Por fim, resolvemos estudar se a administração de esporos poderia apresentar algum efeito colateral, o que comprometeria seu uso como adjuvante vacinal. Esporos de *B. subtilis* são usados como probióticos em humanos e animais (GUO et al. 2006; PERMPOONPATTANA et al., 2012), mas a segurança da sua inoculação por via parenteral ainda não fora avaliada. Nossos resultados indicam que os esporos de *B. subtilis* podem ser administrados por via subcutânea, sem causar efeitos colaterais mensuráveis e podem ser considerados seguros para inoculação. Nenhuma alteração nos linfonodos inguinais e nos padrões hematológicos e bioquímicos foi detectada, indicando que a administração de esporos pela via subcutânea é segura.

Coletivamente esses dados demonstram que os esporos purificados induzem, de uma forma segura, um aumento na resposta de anticorpos e de linfócitos T contra a proteína p24 do vírus HIV-1, nos dois modelos murinos testados. Esse efeito adjuvante provavelmente está relacionado com a interação dos esporos com as células dendríticas por meio do receptor TLR2. Os resultados apresentados demonstram que esporos representam uma nova alternativa de adjuvantes particulados em formulações vacinais.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho realizou significativos avanços no conhecimento sobre a utilização de esporos de *B. subtilis* como ferramenta biotecnológica. Aperfeiçoamos os métodos de esporulação e purificação de *B. subtilis* o que permitiu a obtenção de uma biomassa de esporos altamente purificados e com alto rendimento. Paralelamente, diminuímos de forma significativa o tempo de execução, os custos e a exigência de equipamentos. Experimentos *in vitro* e *in vivo*, utilizando esporos purificados, forneceram dados importantes para um melhor entendimento dos mecanismos de ação envolvidos com a adjuvantividade dessas partículas. Portanto, nossos resultados nos levam a concluir que o uso de esporos como adjuvante é uma estratégia promissora para o desenvolvimento de formulações vacinais de baixo custo, alta estabilidade e segurança.

REFERÊNCIAS¹

- BANERJEE, K. et al. IgG subclasses profiles in infected HIV type 1 controllers and chronic progressors and in uninfected recipients of Env vaccines. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 26, p. 445-458, 2010.
- BARNES, A. G. C. et al. *Bacillus subtilis* spores: a novel microparticle adjuvant which can instruct a balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen. **Journal of Immunology**, v. 37, p.1-10, 2007.
- BELL, J. K. et al. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. **Trends of Immunology**, v. 24, p. 528-533, 2003.
- BENDELAC, A.; MEDZHITOV, R. Adjuvants of immunity: harnessing innate immunity to promote adaptive immunity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 195, p. 19-23, 2002.
- BHARDWAJ, D. et al. Recombinant HIV-I p24 protein: cloning, expression, purification and use in the development of ELISA kits. **Current Science**, v. 91, p. 913-917, 2006.
- BLACK, M. et al. Advances in the design and delivery of peptide subunit vaccines with a focus on toll-like receptor agonists. **Expert Review of Vaccines**, v. 9, p. 157-173, 2010.
- BOZZACCO, L. et al. Strategy for identifying dendritic cell-processed CD4+ T cell epitopes from the HIV gag p24 protein. **PLoS One**, v. 7, e41897, p. 1-12, 2012.
- BRAGA, C. J. M. et al. Parenteral adjuvant effects of an enterotoxigenic *Escherichia coli* natural heat-labile toxin variant. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. 487, p. 1-11, 2014.
- CHAKRABORTY, S.; RAHMAN, T.; CHAKRAVORTY, R. Characterization of the protective HIV-1 CTL epitopes and the corresponding HLA class I alleles: a step towards designing CTL based HIV-1 vaccine. **Advances in Virology**, v. 2014, p. 1-17, 2014.
- CLEMENTS, C. J.; GRIFFITHS, E. The global impact of vaccines containing aluminium adjuvants. **Vaccine**, v. 20, p. 24-33, 2002.
- CIABATTINI, A. et al. Oral priming of mice by recombinant spores of *Bacillus subtilis*. **Vaccine**, v. 22, p. 4139-4143, 2004.
- COFFMAN, R. L.; SHER, A.; SEDER, R.A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. **Immunity**, v. 33, p. 492-503, 2010.

¹De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

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

DASKALAKIS, D. HIV diagnostic testing: evolving technology and testing strategies. **Topics in Antiviral Medicine**, v. 19, p. 18-22, 2011.

DRAGON, D. C.; RENNIE, R. P. Evaluation of spore extraction and purification methods for selective recovery of viable *Bacillus anthracis* spores. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 100-105.

DRIKS, A. *Bacillus subtilis* spore coat. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 63, p. 1-20, 1999.

DUC, I. H. et al. Bacterial spores as vaccine vehicles. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 2810-2818, 2003.

DUC, L. H. et al. Intracellular fate and immunogenicity of *B. subtilis* spores. **Vaccine**, v. 22, p. 1873-1885, 2004.

EISENBARTH, S. C. et al. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. **Nature**, v. 453, p. 1122-1126, 2008.

FERREIRA, L. C. S.; FERREIRA, R. C.; SCHUMANN, W. *Bacillus subtilis* as a tool for vaccine development: from antigen factories to delivery vectors. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 113-124, 2005.

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, 1966.

FRANCHI, L.; NUNEZ, G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1 β secretion but dispensable for adjuvant activity. **European Journal of Immunology**, v. 38, p. 2085-2089, 2008.

FRENCH, M. A. et al. Vaccine-induced IgG2 anti-HIV p24 is associated with control of HIV in patients with "high-affinity" Fc gamma R1a genotype. **AIDS**, v. 24, p. 1983-1990, 2010.

GONG, X. et al. Glycoprotein 96-mediated presentation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) – specific human leukocyte antigen class I- restricted peptide and humoral immune responses to HIV-1 p24. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, p. 1595-1600, 2009.

GUO, X. et al. Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the *in vivo* effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 90, p. 139-146, 2006.

GUPTA, R. K.; SIBER, G. R. Adjuvants for human vaccines: current status, problems and future prospects. **Vaccine**, v. 14, p. 1263-76, 1995.

GUY, B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 505-517, 2007.

HAGEMAN, J. H. et al. Single, chemically defined sporulation medium for *Bacillus subtilis*: growth, sporulation, and extracellular protease production. **Journal of Bacteriology**, v. 160, p. 438-441.

HARROLD, Z. R.; HERTEL, M. R.; GORMAN-LEWIS, D. Optimizing *Bacillus subtilis* spore isolation and quantifying spore harvest purity. **Journal of Microbiology Methods**, v. 87, p. 325-329, 2011.

HARWOOD, C. R. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. **Trends in Biotechnology**, v. 10, p. 247-256, 1992.

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.

HEFTI, K.; DAVID, G. Safe handling of vaccines: the rewards of rigorous routines. **South Dakota Medicine**, p.119–22, 2013.

HENRIQUES, A. O.; MORAN, C. P. Jr. Structure and assembly of the bacterial endospore coat. **Methods**, v. 20, p.95-110, 2000.

HOA, T. T. et al. Fate and dissemination of *Bacillus subtilis* spores in a murine model. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p.3819–3823, 2001.

HONG, H. A.; DUC, L. H.; CUTTING, S. M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 813-835, 2005.

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

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

IMAMURA D. et al. Proteins involved in formation of the outermost layer of *Bacillus subtilis* spores. **Journal of Bacteriology**, v. 193, p. 4075-4080, 2011.

ISTICATO, R. et al. Assembly of multiple CotC forms into the *Bacillus* spore coat. **Journal of Bacteriology**, v. 1186, p. 1129-1135, 2004.

JEFFERSON, T.; RUDIN, M.; DI PIETRANTONJ, C. Adverse events after immunization with aluminium-containing DTP vaccines: systematic review of the evidence. **Lancet Infectious Diseases**, v. 4, p. 84-90, 2004.

KARLSSON HEDESTAM, G. B. et al. The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 143-155, 2008.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, p. 373-384, 2010.

KENNEDY, M. J.; READER, S. L; SWIERCZYNSKI, L. M. Preservation records of micro-organisms: evidence of the tenacity of life. **Microbiology**, v. 140, p. 2513-2529, 1994.

KIM, J. S.; SCHUMANN, W. Display of proteins on *Bacillus subtilis* endospores. **Cell Molecular Life Science**, v. 66, p. 3127-3136, 2009.

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

KOOL, M.; FIERENS, K.; LAMBRECHT, B. N. Alum adjuvante: some of the tricks of the oldest adjuvante. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 927-934, 2012.

KORSHOLM, K. S. et al. Broadening of the T-cell repertoire to HIV-1 Gag p24 by vaccination of HLA-A2/DR transgenic mice with overlapping peptides in the CAF05 adjuvant. **PLoS One**, v. 8, n. 5, e63575, 2013.

KWISSA, M.; KASTURI, S. P.; PULENDRAN, B. The science of adjuvants. **Expert Review of Vaccines**, v. 6, p. 673-684, 2007.

LAFLAMME, C. et al. Assessment of bacterial endospore viability with fluorescent dyes. **Journal Applied Microbiology**, v. 96, p. 684-692, 2004.

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

LARSEN, N. et al. Characterization of *Bacillus* spp. strains for use as probiotic additives in pig feed. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 1105-1118, 2014.

LEE, S. et al. Efficacy, heat stability and safety of intranasally administered *Bacillus subtilis* spore or vegetative cell vaccines expressing tetanus toxin fragment C. **Vaccine**, v. 28, p. 6658-6665, 2010.

LEENAARS, P. P. et al. Assessment of side effects induced by injection of different adjuvant/antigen combinations in rabbits and mice. **Laboratory Animals**, v. 32, p. 387-406, 1998.

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

LI, H. et al. Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. **Journal of Immunology**, v. 181, p. 17-21, 2008.

LIARD, C. et al. Targeting of HIV-p24 particle-based vaccine into differential skin layers induces distinct arms of the immune responses. **Vaccine**, v. 29, p. 6379-6391, 2011.

LUDEWIG B. et al. *In vivo* antigen loading and activation of dendritic cells via a liposomal peptide vaccine mediates protective antiviral and anti-tumor immunity. **Vaccine**, v. 19, 23-32, 2000.

LYCKE, N. Is the choice of vaccine adjuvant critical for long-term memory development? **Expert Review of Vaccines**, v. 9, p. 1357-1361, 2010.

MARIM, F. M. et al. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. **PLoS One**, v. 5, n. 12, e15263, p. 1-8, 2010.

MBOW, M. L. et al. New adjuvants for human vaccines. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, p. 411-416, 2010.

McKEE, A. S. et al. Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity. **Journal of Immunology**, v. 183, p. 4403-4414, 2009.

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

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.

MONTEIRO, S. M. et al. A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1026-1031, 2005.

MONTOMOLI, E. et al. Current adjuvants and new perspectives in vaccine formulation. **Expert Review of 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.

NEGRI, A. et al. Expression and display of *Clostridium difficile* protein FliD on the surface of *Bacillus subtilis* spores. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 1379-1385, 2013.

NGO-GIANG-HUONG, H. et al. HIV type 1-specific IgG2 antibodies: markers of helper T cell type 1 response and prognostic marker of long-term nonprogression. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 17, 1435-1446, 2001.

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.

NICHOLSON, W. L.; SETLOW, P. Sporulation, Germination and Outgrowth. In: HARWOOD, C. R.; CUTTING, S. M. (Eds). **Molecular Biological Methods for *Bacillus***. John Wiley & Sons Ltd, p. 391-429, 1990.

NING, D. et al. Surface-displayed VP28 on *Bacillus subtilis* spores induce protection against white spot syndrome virus in crayfish by oral administrations. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 1327-1336, 2011.

O'HAGAN, D. T.; GREGORIO, D. E. The path to a successful vaccine adjuvant: the long and winding road. **Drug Discovery Today**, v.14, p.541-551, 2009.

O'HAGAN, D. T.; VALIANTE, N. M. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 727-735, 2003.

O'HAGAN, D. T.; RAPPUOLI, R. The safety of vaccines. **Drug Discovery Today**, v. 9, p. 846-854, 2004.

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

O'NEILL, L. A.; BOWIE, A. G. The Family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 353-364, 2007.

PASHINE, A.; VALIANTE, N. M.; ULMER, J. B. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. **Nature Medicine**, v. 11, p. 63-68, 2005.

PERMPOONPATTANA, P. et al. Evaluation of *Bacillus subtilis* strains as probiotics and their potential as a food ingredient. **Beneficial Microbes**, v. 3, p. 127-135, 2012.

PERMPOONPATTANA, P. et al. Immunization with *Bacillus subtilis* spores expressing toxin A peptide repeats protects against infection with *Clostridium difficile* strains producing toxins A and B. **Infection and Immunity**, v. 79, p. 2295-2302, 2011.

RAPPUOLI, R. et al. Vaccines for the twenty-first century society. **Nature Reviews of Immunology**, v. 11, p. 865-872, 2011.

REED, S. G et al. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends in Immunology**, v. 30, p. 23-32, 2008.

RICCA, E.; CUTTING, S. M. Emerging applications of bacterial spores in nanobiotechnology. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 1, 1-10, 2003.

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

RUELAS, D. S.; GREENE, W. C. An integrated Overview of HIV-1 Latency. **Cell**, v. 155, p. 519-529, 2013.

SEYDLOVÁ, G., SVOBODOVÁ, J. Rapid and effective method for the separation of *Bacillus subtilis* vegetative cells and spores. **Folia Microbiologica**, v. 57, p. 455-457, 2012,

SLEASMAN, J. W.; GOODENOW, M. M. HIV-1 infection. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, p. 582-592, 2003.

SONENSHEIN, A. L. Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, p. 561–566, 2000.

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

STEINMAN, R. M.; POPE, M. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, p. 1519-1526, 2002.

STILLS, H. J. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. **Ilar Journal**, v. 46, p. 280-293, 2005.

SUTTENT, R. et al. p24 Antigen detection assay modified with a booster step for diagnosis and monitoring of human immunodeficiency virus type I infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 1016-1022, 2003.

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.

UNAIDS. **Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013**. United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). 2013. Disponível em: <http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013_en.pdf>. Acesso em: 04 jun. 2014.

VAN DUIN, D.; MEDZHITOV, R.; SHAW, A. C. Triggering TLR signaling in vaccination. **Trends in Immunology**, v. 27, p. 49-55, 2006.

VOGELBRUCH, M. et al. Aluminium induced granulomas after inaccurate intradermal hyposensitization injections of aluminium-adsorbed depot preparations. **Allergy**, v. 55, p. 883-887, 2000.

WANG, J.; FUNG, D. Y. Alkaline-fermented foods: a review with emphasis on pidan fermentation. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 22, p. 101-138, 1996.

WATANABE, H. et al. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. **Shock**, v. 22, p. 460-466, 2004.

WEHRL, W.; NIEDERWEIS, M.; SCHUMANN, W. The FtsH protein accumulates at the septum of *Bacillus subtilis* during cell division and sporulation. **Journal of Bacteriology**, v.182, p. 3870-3873, 2000.

WESSMAN, M. J.; THEILGAARD, Z.; KATZENSTEIN, T. L. Determination of HIV status of infants born to HIV-infected mothers: a review of the diagnostic methods with special focus on the applicability of p24 antigen testing in developing countries. **Scandinavian Journal of Infectious Disease**, v. 44, p. 209–215, 2012.

ZAMAN, M.; TOTH, I. Immunostimulation by synthetic lipopeptide-based vaccine candidates: structure-activity relationships. **Frontiers of Immunology**, v. 4, p. 318–330, 2013.

ZANONI, I. et al. CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation. **Nature**, v. 460, p. 264–268, 2009.

ZHAO, J. et al. Evaluation of endospore purification methods applied to *Bacillus cereus*. **Separation and Purification Technology**, v. 61, p. 341–347, 2008.

APÊNDICE A

Curr Microbiol
DOI 10.1007/s00284-012-0269-2

***Bacillus subtilis* Endospores at High Purity and Recovery Yields: Optimization of Growth Conditions and Purification Method**

Milene B. Tavares · Renata D. Souza · Wilson B. Luiz ·
Rafael C. M. Cavalcante · Caroline Casaroli · Eduardo G. Martins ·
Rita C. C. Ferreira · Luís C. S. Ferreira

Received: 4 June 2012 / Accepted: 9 November 2012
© Springer Science+Business Media New York 2012

Abstract *Bacillus subtilis* endospores have applications in different fields including their use as probiotics and antigen delivery vectors. Such specialized applications frequently require highly purified spore preparations. Nonetheless, quantitative data regarding both yields and purity of *B. subtilis* endospores after application of different growth conditions and purification methods are scarce or poorly reported. In the present study, we conducted several quantitative and qualitative analyses of growth conditions and purification procedures aiming generation of purified *B. subtilis* spores. Based on two growth media and different incubations conditions, sporulation frequencies up to 74.2 % and spore concentrations up to 7×10^9 spores/ml were achieved. Application of a simplified spore isolation method, in which samples were incubated with lysozyme and a detergent, resulted in preparations with highly purified spores at the highest yields. The present study represents, therefore, an important contribution for those working with *B. subtilis* endospores for different biotechnological purposes.

Introduction

Bacillus endospores represent the most resilient life form on our planet and reflect the outcome of precisely regulated genetic networks leading to unique cellular structures [1]. In addition, *Bacillus* spores, particularly those produced by *Bacillus subtilis*, have received growing interest as cellular tools with different biotechnological applications. For instance, *B. subtilis* spores have been successfully used as probiotics for humans and animals, as bioindicators for the validation of sterilization processes and as heat-stable live vaccine vectors, in which target antigens are genetically fused to spore coat proteins or expressed after spore germination [1, 3, 7, 9, 13]. Nonetheless, contamination of spore preparations with viable or inactivated vegetative cells, or even cell debris, may cover the immune responses induced by the spore-associated antigens. Therefore, production of highly purified spores at high yields represents an essential process in the development of spore-based vaccine vectors.

Production and purification of *B. subtilis* spores, as well as other *Bacillus* species, involve two major steps. The first one is the generation of a good spore crop that can be achieved only at specific growth conditions, and the second step is the spore purification procedure itself in which spores must be separated from non-sporulating cells and cellular debris. Several spore purification protocols have been reported using different *Bacillus* species but quantitative data of the recovery yields and purity levels, regarding contamination with vegetative cells and cellular debris, are usually poorly reported [2, 5, 10]. In fact, the *Bacillus* spore purification methods, current described in the literature, make use of laborious and rather expensive technologies [6, 8].

In an attempt to improve the reproducibility of the method and obtain samples at high purity and reasonable recovery yields, we performed a systematic quantitative

Milene B. Tavares and Renata D. Souza contributed equally to this study.

M. B. Tavares · R. D. Souza · W. B. Luiz · C. Casaroli ·
E. G. Martins · R. C. C. Ferreira · L. C. S. Ferreira (✉)
Vaccine Development Laboratory, Department of Microbiology,
Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo,
Avenida Lineu Prestes, 1374, São Paulo, SP 05508-900, Brazil
e-mail: lcsf@usp.br

R. C. M. Cavalcante
Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences,
University of São Paulo, São Paulo, Brazil

analysis of sporulation conditions and spore purification methods using the most widely used *B. subtilis* laboratory strain cultivated under ordinary growth conditions. Based on the results generated during this study, we established a methodology which allowed high sporulation frequencies and defined the most important steps required for the purification of spores.

Materials and Methods

Bacterial Culture and Sporulation

The *B. subtilis* 1012 strain (*leuA8 metB5 trpC2 hsdRM1 amyE::neo*) was kindly provided by Dr. Wolfgang Schumann from University of Bayreuth, Germany. This strain is registered in *Bacillus* Genetic Stock Center (code BGSC 1A982) and has been maintained as frozen stock in our bacterial strain collection during the last 10 years. The *B. subtilis* 1012 strain was initially cultivated in Luria–Bertani (LB) liquid medium with neomycin sulfate (25 µg/ml) for 16 h at 37 °C in an orbital incubator shaker. Sporulation was performed in two growth media, without the addition of antibiotics: Difco sporulation media (DSM), described by Nicholson and Setlow [12], and the F medium, modified from Foerster and Foster [4] composed of 1 % glucose, 0.1 % L-glutamate, 0.05 % yeast extract, 0.5 % KH₂PO₄, 0.1 % (NH₄)₃PO₄, 0.02 % MgSO₄, 0.01 % NaCl, 0.005 % CaCl₂, 0.0007 % MnSO₄, 0.001 % ZnSO₄, and 0.001 % FeSO₄. Sporulation in liquid media was performed in Erlenmeyer flasks containing 20 ml of medium inoculated with 0.2 ml of an overnight grown culture. Flasks were kept at 37 °C in an orbital shaker at 200 rpm for 24 h or 72 h. Sporulation on plates was performed using 0.2 ml culture samples spread on agar plates (1.5 % agar in 20 ml of medium) in a regular Petri dish (8 cm in diameter) and incubated at 37 °C for 24 or 72 h. After incubation time, spores in the plates were resuspended in 5 ml of phosphate-buffered saline (PBS) by pipetting, transferred to a 50 ml polypropylene tube, and the volume was adjusted to 20 ml.

Determination of Sporulation Frequencies

Spore-containing *B. subtilis* cultures were serially diluted and plated on LB plates with neomycin before and after applying a heat treatment that eliminates the vegetative cells but not the spores (65 °C for 1 h). Plates were incubated for 16 h at 37 °C, and the visible colonies were counted. Sporulation frequencies were calculated as the titers of colony forming units (CFU/ml) before and after the heat treatment. Values are expressed as: (Spores titer after the heat treatment/Spores titer before the heat treatment) × 100. The experiments were independently

performed at least three times, and each experiment was performed in duplicate.

B. subtilis Spore Purification Methods

We compared two spore purification procedures: (1) Method 1, described by Nicholson and Setlow [12], which consists in centrifugation of cells for 10 min at 10,000×g at 4 °C, and washing the cells with 1 M KCl and 0.5 M NaCl. The cells were suspended in 50 mM Tris HCl (pH 7.2), and lysozyme was added to a final concentration of 50 µg/ml followed by incubation at 37 °C for 1 h. After incubation, the cells and spores were pelleted and washed once with distilled water and once with 0.05 % sodium dodecyl sulfate (SDS) solution. After suspension by vortexing, spores were pelleted and homogenized with TEP buffer (50 mM Tris–HCl (pH 7.2) and 10 mM EDTA), centrifuged for 10 min at 10,000×g at room temperature and washed three times (10 min, 10,000×g) with distilled water and suspended in 1 volume of water. Method 2, consists in centrifugation of the cells for 10 min at 10,000×g at 4 °C and suspending the pellets with 50 mM Tris–HCl (pH 7.2) containing 50 µg/ml of lysozyme. Samples were incubated for 1 h at 37 °C and washed once with 1 volume of distilled water. Pellets were centrifuged, and suspended with 0.05 % SDS solution by vortexing. Samples are washed three times with distilled water and suspended in 1 volume of distilled water.

Determination of Spore Purity and Recovery Yields

Purity of the spore preparations was evaluated after serial dilutions of the spore suspensions and determination of the Spores titers before and after the heat treatment (65 °C, 1 h) that inactivates only vegetative cells. The purity values were expressed as: (Spores titer after the heat treatment/Spores titer before the heat treatment) × 100. Spore recovery yields were determined as the percentages of spores recovered after application of the purification method with regard to the initial number of spores in the culture. The values were expressed as: (Spores titer at the end of the purification procedure/Spores titer before application of the spore purification procedure) × 100. The determinations were independently repeated at least three times, and each experiment was carried out in quadruplicates. Overall efficacy values of each spore purification method were calculated as the arithmetic means of spore purity and the recovery yield of each tested procedure.

Image Analysis

Samples (50 µl) of each preparation or culture were smeared onto glass slides, air-dried, and analyzed using a

phase-contrast microscope (EVOS fl, AMG, Bothell, USA). At least ten images of each preparation were acquired, and one representative image of each preparation was presented.

Statistical Analyses

The results were analyzed with GRAPHPAD PRISM 5 software and were expressed as the means $\pm$ SD.

Fig. 1 Effects of different growth conditions on the sporulation frequency of the *B. subtilis* 1012 strain. **a** Cultivation in DSM medium. **b** Cultivation in F medium. Bars values represent percentage of sporulation frequency. Total number of viable spores are indicated by symbols (Δ) connected by a dotted line. Values represent the averages of three independent experiments

Table 1 Comparison of spore purification methods regarding purity and recovery yields using the *B. subtilis* 1012 strain

Medium (broth)	Incubation (h)	Sporulation frequency (%) ^a	Purity (%)		Yield (%)		Efficacy (%)	
			Method ^b		Method ^b		Method ^b	
			1	2	1	2	1	2
DSM	24	45.5	89	93.5	32	100	60.5	96.7
	72	15.1	87.9	97.7	3.6	4.7	45.7	51.2
F	24	13.2	47.1	95.6	0.14	6.1	23.6	50.9
	72	74.2	82.4	99.1	0.7	100	41.5	99.6

^a Sporulation frequencies represent the number of vegetative cells giving rise to a viable spore. The values were expressed as (spores titer/culture titer) $\times$ 100 before application of the tested spore purification methods. Culture titers (vegetative cells and spores) and spores titers were determined before and after application of the heat treatment at 65 °C for 1 h, respectively

^b Spore purification procedures: method 1 as previously described by Nicholson and Setlow [12] and method 2, the lysozyme/SDS treatment as described in the “Materials and methods” section

Statistically significant differences (** $P < 0.01$) were determined with two-way ANOVA and Student's *t* test.

Results and Discussion

Effect of Growth Conditions on *B. subtilis* Sporulation Frequencies

Initially, we determined the sporulation frequencies of the tested *B. subtilis* strain submitted to different growth conditions. We tested two growth media (DSM and F), two incubation times (24 and 72 h), and cultures prepared in broth or plates. Under the testing conditions, the *B. subtilis* 1012 strain reached sporulation frequencies of 45.5 and 15.1 % (with spore concentrations of 4×10^8 and 6.7×10^8 spores/ml) in DSM broth after incubation for 24 or 72 h, respectively (Fig. 1a; Table 1). On the other hand, samples cultivated in plates reached a maximum sporulation frequency of 35.9 % after incubation for 72 h and concentrations up to 10^8 spores/ml after incubation for 24 h (Fig. 1a).

Sporulations performed in F broth were more dependent of the incubation time (Fig. 1b; Table 1). A sporulation frequency of 13.2 % was achieved following incubation in broth for 24 h (with a spore concentration of 6.5×10^6 spores/ml) while higher sporulation frequencies (74.2 %) and spore concentrations (1.2×10^9 spores/ml) were observed after incubation in broth for 72 h. Cultures prepared on plates incubated, either for 24 h or 72 h, showed sporulation frequencies that ranged from 14.4 to 48.8 %, respectively, and spore concentrations up to 9.5×10^6 spores/ml after incubation for 24 h (Fig. 1b). Collectively, these results indicate that for the widely used *B. subtilis* 1012 laboratory strain higher sporulation frequencies and spore concentrations are obtained in cultures prepared in F broth incubated for 72 h at 37 °C.

Purity of Spores Prepared with Optimized Purification Method

In order to improve the spore purity and simplify the overall spore purification procedure, we compared a

Fig 2 Evaluation of the spore preparations after application of the purification methods 1 (black bars) or 2 (open bars). **a** Purity of the spore preparations after purification. Bacterial cultures were incubated for 24 or 72 h in DSM or F medium broth. **b** Spore recovery yields of purified samples. The values were expressed as total of viable spore in 20 ml cultures. The results represent the average of three independent experiments carried out in duplicate. Statistically significant difference (** $P < 0.01$)

commonly used spore purification method (method 1) with a simplified procedure that included the lysozyme/SDS treatment (method 2). The purity of spores obtained with method 1 ranged from 47.1 % (cultures prepared in F medium for 24 h) to approximately 90 % (cultures prepared in DSM medium both after 24 or 72 h) (Fig. 2a). The results showed that procedures based on successive washing steps carried out only with water, detergent or lysozyme resulted in negligible to very low spore purity values (data not shown).

In contrast, treatment with method 2 resulted in highly purified spore samples (above 90 % purity values in all tested conditions and cultivation times) with values ranging from 93.5 % (in DSM broth after cultivation for 24 h) to 99.1 % (in F broth after cultivation for 72 h) (Fig. 2a; Table 1), which were statistically superior to the results obtained with method 1 using the same samples. Noticeably, cultures prepared in plates showed drastically different results with lower spore yields and heavier contamination with vegetative cells that tend to forms

clumps hard to solubilize during the spore purification process. These results indicated that the purification of *B. subtilis* spores can be significantly improved after application of a simplified variation of the original spore isolation technique and appropriate growth conditions leading to spore preparations with negligible contamination with vegetative cells (Fig. 2a; Table 1).

Spore Recovery Yields

The two spore purification methods were compared regarding the final spore recovery yields after cultivation in DSM or F broth. The spore yields ranged from 8.9×10^3 to 2.7×10^7 to spores/ml with method 1, which corresponded to 0.1 to 32 % of the total number of spores initially present at the cultures. On the other hand, application of method 2 resulted in 100 % spore recovery in two cultivation conditions (cultivation in DSM broth for 24 h and F broth for 72 h) with final spore yields ranging reaching values above 10^9 spores/ml (maximum value of 2×10^9

Fig. 3 Microscopic examination of the spore preparations after application of the different spore purification methods. All samples were cultivated in F broth for 72 h at 37 °C. Samples **a** initial bacterial culture before application of the spore purification methods, **b** spores prepared with method 1, **c** spores prepared with method 2, **d** *B. coagulans* spore preparation after purification using method 2. Magnitude: $\times 600$. Upper right side digital zoom (additional amplification of $\times 5$)

spores/ml in cultures cultivated in F broth for 72 h) (Fig. 2b; Table 1).

The purified spore preparations from cultures prepared in F broth for 72 h were also monitored for the presence of dead cells or cellular debris using phase-contrast microscopy. As shown in Fig. 3, before application of the spore purification procedures, cultures exhibited a large number of vegetative cells as well as free spores (panel A). Samples that were submitted to method 1 or 2 did not show residual vegetative cells. However, cellular debris was observed in spore samples prepared with method 1 (panel B) but not in samples prepared with method 2 (panel C). These results showed that method 2 could efficiently eliminate vegetative cells and cell debris with minimal losses of the spores with a concomitant reduction of workload and time required to complete the procedure.

Interestingly, in some samples, the final spore concentration of the purified preparations was superior to those determined in the initial cultures before application of the spore purification procedure. This fact was mainly attributed to the fact that cell filaments containing several spores were counted as a single colony during determination of the culture titer based on colony forming units (unpublished data).

Based on the purity and recovery yields of the different tested conditions procedures, we determined the overall efficacies of the two purification methods using the *B. subtilis* 1012 strain cultures cultivated in broth. As shown in Table 1, the overall efficacy of method 1 ranged from 23.6 to 60.5 % while the efficacy of method 2 ranged from 50.9 to 99.6 %. Altogether, these findings demonstrated that the spore purification method 2 gave better results than method 1, particularly for samples cultivated in F and DSM broth for 72 and 24 h, respectively.

We also evaluated the growth condition based on F medium for 72 h and spore purification method 2 with wild type *B. subtilis* strains and, spore purity values above 70 % were routinely achieved (data not shown). In conclusion, we observed that high sporulation values, and consequently high spore recovery yields, require definition of proper strain-specific growth conditions (unpublished observations). We also tested the reported conditions using a different *Bacillus* specie, the *B. coagulans* strain GanedenBC³⁰ [1]. Based on the optimum growth conditions (cultivation in F broth for 72 h) and the purification method 2 spore samples with purity values of 72 %, concentrations above 10^9 spores/ml were achieved and no cellular debris was observed by microscopic analysis (data not shown and Fig. 3d).

In conclusion, this study showed that purification of *B. subtilis* spores can be significantly improved, regarding both purity and recovery yields by means of simple adjustments of growth conditions and purification method.

Based on the proposed conditions, spores of the *B. subtilis* 1012 strain could be routinely obtained at concentrations above 10^9 spores/ml with cultures prepared in under ordinary laboratory conditions without the need of biofermentors or density-gradient centrifugation. Altogether, these results represent a relevant contribution for those aiming to work with *B. subtilis* spores at high purity including the use of spores as live vaccine vectors or as probiotic.

Acknowledgments The present study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Grants. We gratefully acknowledge Dr. A. L. Sonenshein, Tufts University, for the critical reading the manuscript and helpful suggestions. We also acknowledge the skillful technical assistance of L.C. Silva.

References

1. Cutting SM (2011) *Bacillus* probiotics. Food Microbiol 28(2):214–220
2. Dragon DC, Rennie RP (2001) Evaluation of spore extraction and purification methods for selective recovery of viable *Bacillus anthracis* spores. Lett Appl Microbiol 33:100–105
3. Ferreira LCS, Ferreira RC, Schumann W (2005) *Bacillus subtilis* as a tool for vaccine development: from antigen factories to delivery vectors. An Acad Bras Cienc 77:113–124
4. Foerster HF, Foster JW (1966) Endotrophic calcium, strontium, and barium spores of *Bacillus megaterium* and *Bacillus cereus*. J Bacteriol 91:1333–1345
5. Hageman JH, Shankweiler GW, Wall PR, Franich K, McCowan GW, Cauble SM, Grajeda J, Quinones C (1984) Single, chemically defined sporulation medium for *Bacillus subtilis*: growth, sporulation, and extracellular protease production. J Bacteriol 160:438–441
6. Harrold ZR, Hertel MR, Goman-Lewis D (2011) Optimizing *Bacillus subtilis* spore isolation and quantifying spore harvest purity. J Microbiol Methods 87(3):325–329
7. Klämpfl TG, Isbary G, Shimizu T, Li YF, Zimmermann JL, Stolz W, Schlegel J, Morfill GE, Schmidt HU (2012) Cold atmospheric air plasma sterilization against spores and other microorganisms of clinical interest. Appl Environ Microbiol 78(15):5077–5082
8. Laflamme C, Lavigne S, Ho J, Duchaine C (2004) Assessment of bacterial endospore viability with fluorescent dyes. J Appl Microbiol 96(4):684–692
9. Luiz WB, Cavalcante RCM, Paccez JD, Souza RD, Sbraggio-Almeida ME, Ferreira RRC, Ferreira LCS (2008) Boosting systemic and secreted antibody responses in mice orally immunized with recombinant *Bacillus subtilis* strains following parenteral priming with a DNA vaccine encoding the enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) CFA/I fimbriae B subunit. Vaccine 26:3998–4005
10. Monteiro SM, Clemente JJ, Henriques AO, Gomes RJ, Carrondo MJ, Cunha AE (2005) A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. Biotechnol Prog 21:1026–1031
11. Nicholson WL, Munakata H, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P (2000) Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. Microbiol Mol Biol Rev 64:548–572
12. Nicholson WL, Setlow P (1990) Sporulation, germination and outgrowth. In: Harwood CR, Cutting SM (eds) Molecular

- biological methods for *Bacillus*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, pp 391–450
13. Paccetz JD, Nguyen HD, Luiz WB, Ferreira RCC, Sbrogio-Almeida ME, Schumann W, Ferreira LCS (2005) Evaluation of different promoter sequences and antigen sorting signals on the immunogenicity of *Bacillus subtilis* vaccine vehicles. *Vaccine* 25:4671–4680

APÊNDICE B

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Bacillus subtilis Spores as Vaccine Adjuvants: Further Insights into the Mechanisms of Action

Renata Damásio de Souza¹, Milene Tavares Batista¹, Wilson Barros Luiz¹, Rafael Ciro Marques Cavalcante², Jaime Henrique Amorim¹, Raiza Sales Pereira Bizerra¹, Eduardo Gimenes Martins¹, Luís Carlos de Souza Ferreira^{1*}

¹ Vaccine Development Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ² Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract

Bacillus subtilis spores have received growing attention regarding potential biotechnological applications, including the use as probiotics and in vaccine formulations. *B. subtilis* spores have also been shown to behave as particulate vaccine adjuvants, promoting the increase of antibody responses after co-administration with antigens either admixed or adsorbed on the spore surface. In this study, we further evaluated the immune modulatory properties of *B. subtilis* spores using a recombinant HIV gag p24 protein as a model antigen. The adjuvant effects of *B. subtilis* spores were not affected by the genetic background of the mouse lineage and did not induce significant inflammatory or deleterious effects after parenteral administration. Our results demonstrated that co-administration, but not adsorption to the spore surface, enhanced the immunogenicity of that target antigen after subcutaneous administration to BALB/c and C57BL/6 mice. Spores promoted activation of antigen presenting cells as demonstrated by the upregulation of MHC and CD40 molecules and enhanced secretion of pro-inflammatory cytokines by murine dendritic cells. In addition, *in vivo* studies indicated a direct role of the innate immunity on the immunomodulatory properties of *B. subtilis* spores, as demonstrated by the lack of adjuvant effects on MyD88 and TLR2 knockout mouse strains.

Citation: de Souza RD, Batista MT, Luiz WB, Cavalcante RCM, Amorim JH, et al. (2014) *Bacillus subtilis* Spores as Vaccine Adjuvants: Further Insights into the Mechanisms of Action. PLoS ONE 9(1): e87454. doi:10.1371/journal.pone.0087454

Editor: Mauricio Martins Rodrigues, Federal University of São Paulo, Brazil

Received: October 15, 2013; **Accepted:** December 27, 2013; **Published:** January 27, 2014

Copyright: © 2014 de Souza et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Foundation of the State of São Paulo (FAPESP) and the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: lcsf@usp.br

Introduction

Adjuvants are compounds that enhance the potency, quality or longevity of specific immune responses. The purpose of adding an adjuvant to a vaccine formulation is to enhance the immunogenicity of the co-administered antigens, reduce the number of doses required for protective immunity and improve the efficacy of vaccines in poor responder populations [1,2]. In general, adjuvants can be classified as delivery systems, immunopotentiators or a combination of both. Delivery systems, such as mineral salts, emulsions and liposomes, efficiently present the antigens to the immune system by aggregating and controlling antigen release. Immunopotentiators, such as cytokines, saponins and Toll-like receptor agonists, increase the immune response to antigens by stimulating the innate immune cells directly [3–5]. These adjuvants boost immunity by activating antigen-presenting cells (APCs), which increase the expression of MHC I and/or II molecules, cytokines and the co-stimulatory molecules that are required for T-cell contact and activation. APC maturation determines the magnitude and the type of the T and B cell responses [6].

The identification and development of new adjuvants is a priority since the currently licensed adjuvants for human use do not always induce a potent immune response against different target pathogens, especially in immunologically hyporesponsive

populations [4]. Modern adjuvants should induce a strong and balanced immune response with reduced reactogenicity. Furthermore, a good adjuvant should preferentially have a long shelf life and a low production cost [5].

Previous studies have demonstrated that *Bacillus subtilis* spores show a significant adjuvant effect leading to enhanced antibody responses to either co-administered antigens or antigens that are adsorbed on the spore surface [7–9]. *B. subtilis* is a gram-positive nonpathogenic and endospore-forming bacterium species that has been used as a tool for different biotechnological applications, such as probiotic formulations for both humans and animals, expression systems for heterologous protein production and vaccine vehicles for the mucosal delivery of antigens [10,11,12]. *B. subtilis* can be genetically engineered to express heterologous antigens soon after spore germination or be presented at the spore surface as fusions with spore coat proteins [13,14]. *B. subtilis* endospores offers unique resistance properties and can survive for long periods of time under a range of stress conditions, such as high temperature, desiccation, absence of nutrients and exposure to chemical solvents. These features facilitate the storage and transport of these endospores [15].

In this study, we evaluated additional details of the immunological mechanisms leading to the adjuvant properties of *B. subtilis* spores. For that purpose, we used the capsid protein gag p24 from HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus type 1) as a target

antigen. Gag p24 is an immunodominant protein which plays an important role in inducing protective immunity to HIV-1; therefore, it has become an integral component of many vaccine strategies [16,17]. We investigated whether live or heat-killed *B. subtilis* spores can equally promote specific antibody and cell mediated immune responses to co-administered gag p24 in different mouse models that are immunized via the subcutaneous route. Our findings indicate that the adjuvant effects of *B. subtilis* spores are not affected by the genetic background of the host lineage and require the involvement of the innate immune system for proper stimulation of adaptive immune responses.

Materials and Methods

Ethics Statement

All procedures and experiments involving mice were performed with prior approval by the committee on the ethical use of laboratory animals from the Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo (Protocol #045) and in accordance with the recommendations in the guidelines for the care and use of laboratory animals of the National Committee on the Ethics of Research (CONEP).

Bacterial strains and spore preparation

The *B. subtilis* WW02 strain (*leuA8 metB5 trpC2 hsdRMI amyE::neo*) was kindly provided by Dr. Wolfgang Schumann from University of Bayreuth, Germany. *B. subtilis* WW02 is a widely used strain, which is a derivative from *B. subtilis* 1012, a reference laboratory strain with a sequenced genome and known physiological features [18,19]. Spores were prepared from this strain, as previously described [20]. Briefly, sporulation of *B. subtilis* was induced following cultivation in F medium for 72 h at 37°C. The culture was centrifuged, and the pellet was suspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.2) containing 50 µg/mL of lysozyme and incubated for 1 h at 37°C. The spores were then washed sequentially with distilled water, 0.05% SDS and three washes with distilled water. The concentration of the viable spores was determined by plating serial dilutions of the heat-treated samples (60 min at 65°C) on LB plates. Spores were killed by autoclaving at 121°C for at least 30 minutes.

Purification of recombinant p24

Recombinant p24 with an N-terminal histidine tag was purified by affinity chromatography [unpublished data]. Briefly, *E. coli* BL21 (DE3) cells (Invitrogen) were transformed with the recombinant pET28b/p24 vector and used as the host for protein expression after induction with 0.5 µM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Fermentas Life Technologies). The cells were harvested 2 h post-induction by centrifugation, and the cell pellet was suspended in buffer A (500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 1 mM PMSF, pH 8). The cells were lysed and centrifuged, and the supernatant was clarified with a 0.45 µm mesh membrane filter. Protein purification was carried out in a HisTrapTM HP column (GE Healthcare Bio-Sciences Corp) by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) using an AKTA model FPLC equipment (Healthcare Bio-Sciences Corp). The column was washed with buffer A and the bound proteins were eluted using a linear gradient with buffer B (500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 1 M Imidazole, pH 8). The peak fractions were dialyzed against phosphate buffered saline (PBS) and concentrated using a membrane filter with a 5 kDa cutoff value (Millipore). The protein concentration was determined using a Bicinchoninic acid (BCA) assay (Pierce) and the purity was monitored by SDS-PAGE. Endotoxin level was equal or lower than 2.0 EU/µg of protein,

after its removal by successive washing steps with 1% Triton X-114 [21].

Adsorption of proteins to spores

Protein adsorption to spores was carried out as previously described [7]. Briefly, 2 µg of the recombinant purified p24 protein was added to a suspension containing 2×10^9 spores in 0.2 mL of 1X PBS at pH 4, pH 7 or pH 10. The pH was adjusted using HCl or NaOH. After 1 h of incubation at room temperature, the spores were washed 2 times with 1X PBS by centrifugation, and the pellets resuspended in the same buffer. The amount of protein adsorbed to the spore coat, after the washing steps, was quantified by dot-blot assay, as previously described [22].

Mice and immunization regimens

Pathogen-free BALB/c, C57BL/6, MyD88 and TLR2 deficient mice (C57BL/6 genetic background) at 6–8 weeks of age were used for these studies. The animals were supplied by the Isogenic Mouse Breeding Facilities of the Departments of Parasitology and Immunology, Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo (USP). Groups of five animals were submitted to an immunization regimen comprising three doses administered via the subcutaneous route on days 0, 14, 21. Mice were inoculated with 700 ng of p24 alone, 700 ng of p24 in combination with 15 µg of Alum, 10 µg of p24 admixed with 1 µg of LT1, 2×10^9 of live *B. subtilis* spores adsorbed with 700 ng of p24 and 700 ng of p24 mixed with 2×10^9 of live or heat-killed spores. This mixture was performed using 0.2 mL of 1X PBS at pH 10 and the inoculation of mice was done right after the mixing, in order to avoid any adsorption of the antigen to the spore surface. The control groups received sterile PBS. Sera samples were collected one day before each dose to analyze the antibody production.

Serum antibody detection

Antigen-specific antibodies in serum were analyzed by ELISA, according to previously described procedures, with minor modifications [23,24]. Maxisorp plates (Nunc) were coated with purified p24 protein (300 ng/well) diluted in PBS at pH 7.5 and were incubated overnight at 4°C. The wells were washed three times with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T) and were blocked with 1% BSA in PBS for 2 h at 37°C. Serum samples were serially diluted in blocking solution and incubated for 1 h at 37°C. Antibody levels were detected using horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG, IgG1, IgG2a or IgG2c (Sigma and Southern Biotech) for 1 h at 37°C. The color was developed with the addition of ortho-phenylenediamine (OPD) substrate, and the absorbance was measured at 492 nm.

Determination of CD4⁺ and CD8⁺ T cell response

Two weeks after the last immunization, the mice were euthanized, and the spleens were removed. The cell suspension was obtained by macerating the spleen and treating the cells with ammonium chloride and potassium (ACK buffer) to lyse the erythrocytes. The spleen cells were stimulated for 16 h, at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere and in the presence of brefeldin-A, with a synthetic peptide (GenScript) corresponding to the CD4 (AMQMLKETINEEAAE) or CD8 (AMQMLKETI) T cell-specific epitope of the HIV gag p24 protein, at a final concentration of 5 µg/mL or 10 µg/mL, respectively. Following incubation, cells were washed twice in PBS supplemented with 2% of fetal bovine serum (FBS) and surface stained with anti-CD8 fluorescein isothiocyanate (FITC) and anti-CD4 Cy (BD BioSci-

ences). Next, the cells were washed, fixed with paraformaldehyde and permeabilized with saponin, and then intracellularly stained for IL-4 or IFN- γ phycoerythrin (PE) (BD BioSciences). FACS analysis was performed on a BD FACSCalibur flow cytometer, and the results were analyzed using FlowJo (Tree Star) software.

Bone-marrow-derived dendritic cells (BMDC) generation

Murine BMDCs were prepared as formerly described [25,26] with minor modifications. Briefly, cells were collected from the femoral bone of 6–12 week old C57BL/6 mice, were seeded into non-treated cell culture plates and were cultured at 37°C and 5% CO₂ for 8–9 days in 10 mL of conditioned medium (RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 100 U/mL of Penicillin/Streptomycin, 4% non-essential amino acids, 90 μ M β -mercaptoethanol, 30 ng/mL murine GM-CSF and 10 ng/mL of IL-4). On day 4, the supernatant was gently removed and replaced with the same volume of pre-warmed conditioned medium. On day 8, BMDCs were collected from the plate and washed once with PBS.

Effect of *B. subtilis* spores on APCs *in vitro*

BMDCs were treated with PBS, 1 μ g of LT1 and live or heat-killed spores at a multiplicity of infection (MOI) of 10000. Twenty-four hours later, the culture supernatants were collected, and the cytokine levels were determined by ELISA using commercially available sets OptEIA (BD Pharmingen). For flow cytometry analysis, cells were collected and stained for 30 min at 4°C with PE-labeled anti-CD11c, APC-labeled anti-CD40 and FITC-labeled anti-MHC I and anti MHC II (BD Pharmingen). After three washing steps, the cells were resuspended in PBS and the samples were analyzed by first gating on CD11c positive cells and then examined for expression of costimulatory molecules. Sixty thousand events were acquired using a FACSCalibur™ (Becton Dickinson) flow cytometer, and the data were analyzed using the FlowJo software (Tree Star).

Monitoring damages in immunized mice

One day after the third dose, the animals were bled via the retro-orbital plexus for the individual determination of lactate dehydrogenase (LDH) and C-reactive protein (CRP) levels, using analytical kits as recommended by the supplier (Laborclin and Bioclin, Brazil, respectively). Complete blood cell counts were also taken at this time. Whole blood samples were used to evaluate five hematological parameters: white blood cells (WBC), monocytes (MON), lymphocytes (LYM), neutrophils (NEU) and eosinophils (EOS). WBC counts were carried out using a Neubauer chamber and MON, LYM, NEU and EOS counts were performed using a phase contrast microscope (Eclipse E200 model, Nikon) [27].

Statistical analyses

Statistical significance ($p < 0.05$) was determined using two-way ANOVA followed by the Bonferroni posttest. The mean fluorescence intensity (MFI) data were analyzed by Student's *t* test. Analyses were conducted using GRAPHPAD PRISM 5 software and were expressed as the means $\pm$ standard error of mean (s.e.m.).

Results

The adjuvant effects of co-administered *B. subtilis* spores are independent of host genetic background

B. subtilis spores have been used as particulate adjuvants for enhancing immune responses based in two main approaches: co-

Figure 1. Adsorption of the p24 protein to spores of the *B. subtilis* WW02 strain. (A) Evaluation of protein adsorption to spores at different pHs. Spores (2×10^9) were suspended in PBS buffer at pH 4, pH 7 or pH 10, mixed with purified p24 protein (2 μ g) and kept for 1 h at room temperature. The samples were centrifuged, washed twice with PBS and the spore coat proteins were extracted and submitted to electrophoresis in SDS-PAGE at 15%. The control lane (Con) represents spore samples without incubation with the protein and the control lane (Pr) shows 2 μ g of purified p24. Image is representative of four independent experiments. (B) Detection of protein released from spores after adsorption. Spores adsorbed with p24 (PBS at pH 4) were resuspended in PBS at pH 4, pH 7 or pH 10 and incubated for different times. At indicated time points (15, 30, 45, and 60 min) samples were centrifuged and the supernatants and pellet (spores) were loaded onto 15% SDS-PAGE gel. (C) Determination of the saturation curve of p24 protein adsorption to *B. subtilis* spores. Increasing amounts of protein (0.5 to 4 μ g) were added to *B. subtilis* spores (2×10^9) following the procedure described before. The amount of protein adsorbed to the spores coat was quantified by dot-blot assay. doi:10.1371/journal.pone.0087454.g001

administration with soluble antigens or with proteins adsorbed onto the spore surface [7,8]. To verify which strategy would confer stronger adjuvant effects, we used the recombinant HIV-1 gag p24 protein, which has been used in several anti-HIV vaccine strategies as a model antigen [23,24,28]. BALB/c and C57BL/6 mice were immunized with 700 ng of p24 protein alone, co-administered with or adsorbed onto 2×10^9 *B. subtilis* spores. Although we had successfully adsorbed the protein onto the spore surface and obtained the maximum adsorption value (700 ng of

Figure 2. Evaluation of antibody responses following subcutaneous immunization with p24 protein adsorbed or mixed with spores. Mouse groups ($n=5$) were immunized (three doses on days 0, 14 and 28) with 2×10^9 spores ($\square$), 700 ng of p24 only ($\circ$), 700 ng of p24 in combination with 2×10^9 spores ($\blacksquare$) or 700 ng of p24 adsorbed at 2×10^9 spores ($\bullet$). Levels of anti-p24 (A and B) and anti-spores (C and D) specific IgG antibodies were detected in serum samples at 13, 27 and 41 days after immunization in BALB/c and C57 BL/6 mice. The results are presented as the mean $\pm$ s.e.m. of three independent experiments, and the values obtained from PBS immunized mice were subtracted from each group. *** $p < 0.001$ when compared with mice immunized with p24 only. doi:10.1371/journal.pone.0087454.g002

p24) at pH 4 (Fig. 1), the immunization experiments demonstrated no significant adjuvant effect either in BALB/c or C57BL/6 mice (Fig. 2A, 2B). However, co-administration of the protein with spores promoted a significant increase in the antibody titers against p24 in both mice strains, demonstrating that the adjuvant effects are not affected by the genetic background of the host. Additionally, we observed that antibody responses against the spores were generated in all experimental groups with no difference between the two strategies (Fig. 2C, 2D). This leads us to believe that the protein adsorption strategy does not favor the adjuvanticity of spores regarding the humoral immune responses.

Live and heat-killed spores can be used as parenteral adjuvants

We tested whether the co-administration of heat-killed spores could enhance antigen-specific antibody responses. The results

indicate that both live and heat-killed spores induce similar serum anti-p24 IgG levels in both mice strains (Fig. 3A, 3B). A similar behavior was also observed after determining the antigen-specific IgG subclass responses. After the third dose, administration of p24 alone induced an elevated IgG2a/IgG1 and IgG2c/IgG1 ratios, indicating a more Th1-polarized response. On the other hand, mice immunized with p24 co-administered with spores reduced to IgG2a/IgG1 ratio, ranging from 0.7 to 2.59, and IgG1/IgG2c ratio, ranging from 0.6 to 3.6 (Fig. 3C, 3D). The reduction of IgG2a/IgG1 and IgG2c/IgG1 ratios was also observed in mice immunized with p24 in combination with Alum, an adjuvant associated with the induction of Th2 responses [29]. In order to investigate if the balanced distribution of IgG1 and IgG2 isotypes in mice immunized with p24 co-administered with spores was indicative of generation of both Th1 and Th2 responses, the activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses were measured in

Figure 3. Humoral responses after subcutaneous immunization with p24 protein mixed with live or heat-killed spores. Detection of anti-p24 specific IgG antibodies in serum samples of immunized BALB/c (A) and C57 BL/6 mice (B). Mouse groups (n=5) were immunized (three doses on days 0, 14 and 28) with viable spores (Δ), heat-killed spores (HkSp) ($\diamond$), p24 protein ($\circ$), p24 protein in combination with Alum ($\blacksquare$), p24 protein in combination with spores ($\bullet$) or p24 protein in combination with heat-killed spores ($\blacktriangle$). *** $p < 0.001$ when compared with group immunized with p24 only or with each other. Specific IgG subclasses elicited in BALB/c (C) and C57BL/6 (D) mice after complete immunization regimen. The IgG2a/IgG1 or IgG2c/IgG1 ratios are indicated at the top of the figure. * $p < 0.05$ or *** $p < 0.001$. All the results are presented as the mean $\pm$ s.e.m. of three independent experiments, and the values obtained from PBS immunized mice were subtracted from each group. doi:10.1371/journal.pone.0087454.g003

the spleen cells harvested two weeks after the last immunization dose. Co-administration of live or heat-killed spores induced a stronger activation of p24-specific CD4⁺ T cells, which were capable of producing IL-4 or IFN- γ , than the mice immunized with p24 only (Fig. 4A, 4B). Mice immunized with 700 ng of p24 co-administered with spores also showed higher p24 specific CD8⁺ T cell responses than the mice immunized with p24 only (Fig. 4C). Considering that mice immunized with p24 in combination with Alum did not elicit a T cell response higher than mice immunized with p24 only (data not shown), we used, as a control, 10 μ g of p24 admixed with 1 μ g of heat-labile toxin type 1 (LT1) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* previously characterized by the significant humoral and cellular adjuvant effects [30].

Safety evaluation of *B. subtilis* as parenteral adjuvant

To develop a new vaccine adjuvant for human or veterinary use, it is important to evaluate the safety of the vaccine in preclinical studies. To evaluate the safety of *B. subtilis* spores as vaccine adjuvant, we examined the hematological profile (white blood, monocytes, lymphocytes, neutrophils and eosinophils) of mice immunized with three doses of live or heat-killed spores. As indicated in Table 1, no evidence of hematologic disturbances was observed after the subcutaneous administration of the spores. We also evaluated the physical changes (hair loss and local inflammation), the histologic alterations of the inguinal lymph nodes and the non-specific biochemical markers of inflammatory reactions. No differences were found between the control group (immunized

Figure 4. Intracellular cell staining and flow cytometry analysis of p24-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells. BALB/c mice were immunized (three doses on days 0, 14 and 28) with p24 protein (700 ng), p24 (10 μ g) admixed with LT1 (1 μ g), p24 (700 ng) admixed with spores (2×10^9) or p24 (700 ng) admixed with heat-killed spores (2×10^9). Spleen cells were collected two weeks after the last dose, and the detection of IL-4 producing p24-specific CD4⁺ T cells (A) and IFN- γ producing p24-specific CD4⁺ (B) and CD8⁺ T cells (C) was carried out after stimulation with MHC class I or II restricted p24 peptide and cell surface staining for CD8 (FITC), CD4 (Cy) and intracellular staining for IL-4 or IFN- γ (PE). The percentage of each population is indicated in the upper right corners and the frequencies in all groups in the absence of stimulus were below 0.70% (data not shown). Measurements were performed in duplicate for each individual sample, and the data are representative of two independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0087454.g004

subcutaneously with PBS) and the group immunized with spores (data not shown). These data indicate that *B. subtilis* spores, in the complete immunization regimen via the subcutaneous route, are safe for use as a promising adjuvant.

Maturation of dendritic cells by *B. subtilis* WW02 spores

Surface expression of co-stimulatory molecules and cytokine secretion are some of the features observed during activation of

antigen presenting cells, such as dendritic cell (DC), a key step in the generation of an adaptive immune response. A previous report demonstrated that dead *B. subtilis* spores can enhance the expression of MHC-II molecules and the secretion of IL-12 by dendritic cells [9]. In this study, BMDCs were treated with live or heat-killed spores of the *B. subtilis* WW02 strain to determine if spores would induce the maturation of dendritic cells by enhancing the expression of the surface molecules and the

Table 1. Hematological analyses of mice immunized with *B. subtilis* spores^a.

Hematological parameters ^b	BALB/c			C57BL/6		
	PBS	Sp	HkSp	PBS	Sp	HkSp
WBC	55±31	58±13	40±12	61±11	50±17	58±11
MON	3.8±3	1.3±1.1	1.5±1.4	1.8±0.9	1.6±1.3	0.8±0.4
LYM	54±17	41±9	28±6.3	46±9.3	35±9.1	47±10
NEU	10±2.2	15±4.4	7.1±1.8	7.3±3.1	13±8.6	9.7±1.1
EOS	0.9±0.6	0.6±0.1	3.1±3.2	4.6±1.7	0.2±0.3	1.1±0.7

^aFive mice per immunization group were bled 1 day following the final dose.
^bBlood samples were processed to determine white blood cells (WBC), monocytes (MON), lymphocytes (LYM), neutrophils (NEU) and eosinophils (EOS). All the counts are given in 10³ cells/μl.

Data are expressed as the mean ± SD of individual measurements. Differences among groups were not observed after ANOVA and Bonferroni's Multiple Comparison test. The results in this table represent one of two independent experiments.

Sp: *B. subtilis* WW02 spores; HkSp: Heat-killed *B. subtilis* WW02 spores.

doi:10.1371/journal.pone.0087454.t001

secretion of cytokines. Levels of IL-12, TNF- α and IL-1 β detected in supernatants collected from DC cultured *in vitro* were significantly increased after treatment with spores, and the live spores induced a higher secretion of IL-12 than the heat-killed spores (Fig. 5A). FACS analysis of dendritic cells treated with spores revealed increased surface expression of MHC I, MHC II and CD40 molecules, although live spores were more effective in inducing MHC II surface expression (Fig. 5B, 5C). These results indicate that spores can induce DC activation and production of pro-inflammatory cytokines.

The innate immunity and the adjuvant effects of *B. subtilis* spores

DC can express several pattern recognition receptors including the toll-like receptors, which can recognize different molecular patterns that are common in microorganisms. Signals generated from various toll-like receptors determine the nature of immune responses, and the ligands of toll-like receptors are potent stimulators of the adaptive immune system [31]. We evaluated whether live and heat-killed *B. subtilis* spores interact with toll-like receptors and can synergistically potentiate vaccine-induced responses. First, we analyzed if the signaling pathway that is dependent on the adapter protein MyD88 is related to the adjuvant effect of the spores during the humoral response to p24. Wild type and MyD88 knockout C57BL/6 mice received 700 ng of p24 protein alone or co-administered with 2×10⁹ of live or heat-killed spores. In mice immunized with protein p24 only, the humoral immune response was not affected by MyD88 inactivation. However, MyD88 knockout mice did not show enhancement of the p24-specific antibody response after co-administration with either live or heat-killed *B. subtilis* spores (Fig. 6A). Because the MyD88 signaling pathway is involved in the adjuvant effect of spores, we decided to determine which TLR plays a role in this process. Considering that *B. subtilis* vegetative cells and spores can stimulate the *in vitro* expression of TLR2 by dendritic cells [32], we immunized TLR2 knockout C57BL/6 mice with different vaccine formulations. TLR2 knockout mice were not able to elicit a strong systemic antibody response to the antigen with regard to the wild type mouse strain when the protein was co-administered with *B. subtilis* spores (Fig. 6B). These data indicate that the spores interact

with DCs via TLR2 and promote maturation of these cells, leading to enhanced adaptive immune responses.

Discussion

The limited immunogenicity of most purified vaccine antigens has raised interest for new adjuvants with enhanced efficacy and safety. Previous studies have shown that *B. subtilis* spores can enhance the immune response against protein antigens and represent a potential candidate for a novel particulate adjuvant. Nonetheless, a better understanding of the adjuvant activity of *B. subtilis* spores is crucial to design more effective vaccine formulations. The results described in this study clarify the mechanisms underlying the induction of the humoral and cellular immune responses to live and heat-killed spores that are subcutaneously administered to mice.

Initially, we compared the effectiveness of two previously reported approaches in which spores were used as vaccine adjuvants [7,8]. The first approach consisted of the adsorption of proteins onto the spore surface, and the second approach consisted of the co-administration of the spores with the antigen. Our results demonstrated that, in the two tested mouse strains, co-administration of spores result in a better adjuvant effect on the induced antigen-specific antibody response when compared with the results generated in mice immunized with spores in which the antigen was adsorbed on the spore surface. Because the anti-spore antibody responses were similar in both immunization approaches, the lower adjuvanticity recorded with antigen-adsorbed spores could not be attributed to any impairment of the immunization procedure. Although previous studies have shown that the adsorption of proteins onto the spore coat is an effective strategy to increase the antibody response against soluble antigens following mucosal administration [7], we could not confirm this effect using a parenteral administration route.

The genetic background of the mouse strain may affect the Th profile of the induced immune responses in animals submitted to an immunization regimen. C57BL/6 mice characteristically show a Th1 immune response pattern with high production of INF- γ by T cells, whereas BALB/c mice develop a Th2 biased immune response with high production of IL-4 [33]. Previous studies have shown that *B. subtilis* spores can induce a balanced Th1 and Th2 response pattern [8]. In this study, we further confirmed the same immune response pattern induced in both C57BL/6 and BALB/c mouse strains. In addition, specific antibody production and activation of antigen specific IL-4 producing CD4⁺ T cells and IFN- γ producing CD4⁺ T and CD8⁺ T cells were detected after immunization with *B. subtilis* spores. Collectively, these results strongly suggest that spores can elicit both humoral and cellular immune responses which are independent of the host genetic background when administered via parenteral route.

Alum was more efficient to increase the humoral responses against p24 than spores, but failed to increase cellular immune responses to the same antigen. LT1, on the other hand, performed better than spores to induce CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses, but only at experimental conditions in which the antigen was used at a significantly higher concentration. Live and heat-killed spores were equally effective in inducing an increase in the humoral and cellular response against p24, using a lower dose of antigen. Besides the fact that heat-killed spores are as efficient as live spores is a feature that would further facilitate the handling and storage of this adjuvant.

Effective stimulation of T cells requires appropriate signaling provided by matured dendritic cells, such as increased expression of costimulatory molecules and secretion of cytokines, and the

Figure 5. Maturation of dendritic cells after stimulation with *B. subtilis* spores. (A) Induction of pro-inflammatory cytokines after stimulation with spores. BMDCs from C57BL/6 mice were treated with PBS (control group), LT1 and live or heat-killed spores at a MOI of 10,000. Supernatants were collected after 24 h, and the IL-1 β , IL12p70 and TNF- α concentrations were quantified by ELISA. (B) Expression of surface molecules by CD11c⁺ cells following exposure to spores. BMDCs were treated as described above and the surface expression levels of CD40, MHC-I and MHC-II were measured by flow cytometry. Gray-filled histograms represent samples incubated with PBS and open histograms represent samples incubated with spores. The MFI for both conditions is shown in the upper left in each histogram. (C) Graphical comparison of the expression of CD40, MHC-I and MHC-II. Data represent mean values $\pm$ s.e.m. of two independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01 or *** p <0.001 when compared with control group or with each other. Sp: *B. subtilis* WW02 spores; HkSp: Heat-killed *B. subtilis* WW02 spores.
doi:10.1371/journal.pone.0087454.g005

Figure 6. The adjuvant effects of *B. subtilis* spores require stimulation of TLR2. MyD88^{-/-} (A) and TLR2^{-/-} (B) C57 BL/6 mice (n=5) were immunized (three doses on days 0, 14 and 28) with p24 protein only (700 ng) or p24 (700 ng) in combination with live or heat-killed spores (2×10⁹). Levels of anti-p24 specific IgG antibodies were detected in serum samples 13 days after the third dose. The results represent the means ± s.e.m. of two experiments, and the values obtained from PBS immunized mice were subtracted from each group. *** p<0.001.

doi:10.1371/journal.pone.0087454.g006

presentation of antigenic peptides bound to MHC molecules [6]. Our *in vitro* studies showed that live and heat-killed spores can induce the maturation of dendritic cells, increasing the expression of pro-inflammatory cytokines and MHC-I, MHC-II and CD40 molecules, although live spores were more effective than heat-killed spores in inducing MHC-II surface expression and IL-12

secretion. Thus, such increased activation of dendritic cells by live *B. subtilis* spores may be attributed to spore germination, either in the culture medium or inside the cells following phagocytosis, as previously demonstrated to occur [32].

DCs can respond to foreign organisms, initiating an intracellular signaling pathway mediated by the TLR receptor that leads to the production of pro-inflammatory cytokines and costimulatory molecules that link innate and adaptive immunity. MyD88 knockout mice failed to enhance the p24 specific antibody response in the presence of the spores, indicating that the signaling pathway operates through the MyD88 signaling pathway to exert the adjuvant effects in mice. Although the MyD88-dependent pathway is utilized by most of TLRs, our results provide evidence that adjuvanticity of *B. subtilis* spores results from recognition by Toll-like receptor 2 because the adjuvant effect disappeared in immunized TLR2 knockout mice.

Safety issues represent a major challenge in the search of new adjuvants for animals and humans. Our results indicate that *B. subtilis* spores can be administered via parenteral routes without causing measurable side effects and, therefore, can be regarded as safe for parenteral inoculation. No alterations in biochemical and hematological parameters were detected following immunization with the spores, indicating that the subcutaneous administration of a high amount of spores does not pose major safety concern issue.

In summary, our study significantly advances the current understanding of the mechanisms involved with the adjuvanticity of *B. subtilis* spores. We demonstrated that parenteral co-administration of live and killed spores can safely induce an increase of the specific antibody and T cell response to HIV gag p24 antigen in both BALB/c and C57BL/6 murine models. In addition, the spores stimulated DCs to express pro-inflammatory cytokines and costimulatory molecules via TLR2 and MyD88 signaling pathway.

Acknowledgments

We thankfully acknowledge the invaluable technical assistance of Loren C. da Silva, Monica Rodrigues, Náina I. Garcia and Mira Melke de Oliveira.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RDdS MTB WBL RCMC JHA RSPB EGM LCdSF. Performed the experiments: RDdS MTB WBL RCMC JHA RSPB EGM LCdSF. Analyzed the data: RDdS MTB WBL RCMC JHA RSPB EGM LCdSF. Contributed reagents/materials/analysis tools: RDdS MTB WBL RCMC JHA RSPB EGM LCdSF. Wrote the paper: RDdS MTB WBL RCMC JHA RSPB EGM LCdSF.

References

1. Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M (2008) New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol* 30: 23–32.
2. Lambrecht BN, Kool M, Willart MA, Hammad H (2009) Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Curr Opin Immunol* 21: 23–29.
3. O'Hagan DT, Valiante NM (2003) Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov* 2: 727–735.
4. Montomoli E, Picciarella S, Khadang B, Mennitto E, Camerini R, et al. (2011) Current adjuvants and new perspectives in vaccine formulation. *Expert Rev Vaccines* 10: 1053–1061.
5. Heegaard PM, Dedieu L, Johnson N, Le Potier MF, Mockey M, et al. (2011) Adjuvants and delivery systems in veterinary vaccinology: current state and future developments. *Arch Virol* 156: 183–202.
6. Miyaji EN, Carvalho E, Oliveira ML, Raw I, Ho PL (2011) Trends in adjuvant development for vaccines: DAMPs and PAMPs as potential new adjuvants. *Braz J Med Biol Res* 44: 500–513.
7. Huang JM, Hong HA, VanTong H, Hoang TH, Brisson A, et al. (2010) Mucosal delivery of antigens using adsorption to bacterial spores. *Vaccine* 28: 1021–1030.
8. Barnes AGC, Cerovic V, Hobson PS, Klavins LS (2007) *Bacillus subtilis* spores: a novel microparticle adjuvant which can instruct a balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen. *Eur. J. Immunol* 37: 1538–1547.
9. Song M, Hong HA, Huang JM, Colenutt C, Khang DD, et al. (2012) Killed *Bacillus subtilis* spores as a mucosal adjuvant for an H5N1 vaccine. *Vaccine* 30: 3266–3277.
10. Cutting SM (2011) *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol* 28: 214–220.
11. Tavares MB, Silva BM, Cavalcante RCM, Souza RD, Luiz WB, et al. (2010) Induction of neutralizing antibodies in mice immunized with an amino-terminal polypeptide of *Streptococcus mutans* P1 protein produced by a recombinant *Bacillus subtilis* strain. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59: 131–142.
12. Anuquini H, Tzipori S (2012) *Bacillus subtilis*: a temperature resistant and needle free delivery system of immunogens. *Hum Vaccin Immunother* 8: 979–986.
13. Paccet JD, Nguyen HD, Luiz WB, Ferreira RCC, Sbrogio-Almeida ME, et al. (2007) Evaluation of different promoter sequences and antigen sorting signals on the immunogenicity of *Bacillus subtilis* vaccine vehicles. *Vaccine* 25: 4671–4680.
14. Negri A, Potocki W, Iwanicki A, Obuchowski M, Hinc K (2013) Expression and display of *Clostridium difficile* protein FliD on the surface of *Bacillus subtilis* spores. *J Med Microbiol* 62: 1379–1385.

15. Nicholson WL, Munakata H, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P (2000) Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 548–572.
16. Li X, Xu W, Xiong S (2012) A novel tuberculosis DNA vaccine in an HIV-1 p24 protein backbone confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* and simultaneously elicits robust humoral and cellular responses to HIV-1. *Clin Vaccine Immunol* 19: 723–730.
17. Bozzaco L, Yu H, Dengjel J, Trumpheller C, Zebroski HA 3rd, et al. (2012) Strategy for identifying dendritic cell-processed CD4+ T cell epitopes from the HIV gag p24 protein. *PLoS One* 7: e41897. doi: 10.1371/journal.pone.0041897.
18. Wehrl W, Niederweis M, Schumann W (2000) The FisH protein accumulates at the septum of *Bacillus subtilis* during cell division and sporulation. *J Bacteriol* 182: 3870–3873.
19. Deuerling E, Paeslack B, Schumann W (1995) The fisH gene of *Bacillus subtilis* is transiently induced after osmotic and temperature upshift. *J Bacteriol* 177: 4105–4112.
20. Tavares MB, Souza RD, Luiz WB, Cavalcante RCM, Casaroli C, et al. (2013) *Bacillus subtilis* endospores at high purity and recovery yields: optimization of growth conditions and purification method. *Curr Microbiol* 66: 279–285.
21. Aida Y, Pabst MJ (1990) Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *J Immunol Methods* 132:191–195.
22. Breyhan H, Wirths O, Duan K, Marcello A, Retting J, et al. (2009) APP/PS1KI bigenic mice develop early synaptic deficits and hippocampus atrophy. *Acta Neuropathol* 117: 667–685.
23. Liard C, Munier S, Arias M, Joulin-Giet A, Bonduelle O, et al. (2011) Targeting of HIV-p24 particle based vaccine into differential skin layers induces distinct arms of the immune responses. *Vaccine* 29: 6379–6391.
24. Tagliamonte M, Marasco D, Ruggiero A, De Stradis A, Tornesello ML, et al. (2012) HIV p24 as scaffold for presenting conformational HIV Env antigens. *PLoS One* 7: e43318. doi: 10.1371/journal.pone.0043318.
25. Zanon I, Ostuni R, Capuano G, Collini M, Caccia M, et al. (2009) CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation. *Nature* 460: 264–268.
26. Marim FM, Silveira TN, Lima DSJ, Zamboni DS (2010) A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. *PLoS One* 5: e15263. doi: 10.1371/journal.pone.0015263.
27. Amorim JH, Diniz MO, Cariri FA, Rodrigues JF, Bizerra RS, et al. (2012) Protective immunity to DENV2 after immunization with a recombinant NS1 protein using a genetically detoxified heat-labile toxin as an adjuvant. *Vaccine* 30: 837–845.
28. Visciano ML, Tagliamonte M, Tornesello ML, Buonaguro FM, Buonaguro L (2012) Effects of adjuvants on IgG subclasses elicited by virus-like particles. *J. Transl. Med* 10:4. doi: 10.1186/1479-5876-10-4.
29. Fierens K, Kool M (2012) The mechanism of adjuvanticity of aluminium-containing formulas. *Curr Pharm Des* 18: 2305–2313.
30. Rodrigues JF, Mathias-Santos C, Sbrogio-Almeida ME, Amorim JH, Cabrera-Crespo J, et al. (2011) Functional diversity of heat-labile toxin (LT) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*: differential enzymatic and immunological activities of LT1 (hLT) and LT4 (pLT). *J Biol Chem* 286: 5222–5233.
31. Christmas P (2010) Toll-Like Receptors: Sensors that Detect Infection. *Nature Education* 3: 85.
32. Huang JM, La Ragione RM, Nunez A, Cutting SM (2008) Immunostimulatory activity of *Bacillus* spores. *FEMS Immunol Med Microbiol* 53: 195–203.
33. Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A (2004) Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock* 22: 460–466.

APÊNDICE C

9.1 – SÚMULA CURRICULAR.

9.1.1 - *Formação:*

Doutoramento

Pós-graduação do Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo (USP). (Abril/2010 até presente data). Apoio financeiro: FAPESP.

Graduação

Bacharelado em Ciências Biológicas – Universidade de São Paulo (USP). (Janeiro/2005 até Dezembro/2009).

Licenciatura em Ciências Biológicas – Universidade de São Paulo (USP). (Agosto/2008 até Dezembro/2009).

Iniciação Científica

Laboratório CEVAT-GENE. Início: Agosto/2005-Término: Dezembro/2009. Apoio financeiro: FAPESP.

Título do projeto: Listeriolisina O (LLO) como adjuvante de vacinas baseadas em *Bacillus subtilis* como veículo de antígenos heterólogos.

9.1.2 - *Produção Científica:*

LUIZ, W. B.; CAVALCANTE, R. C. M.; PACCEZ, J. D.; **SOUZA, R. D.**; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; FERREIRA, R. C. C.; FERREIRA, L. C. S. Boosting systemic and secreted antibody responses in mice orally immunized with recombinant *Bacillus subtilis* strains following parenteral priming with a DNA vaccine encoding the enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) CFA/I fimbriae B subunit. **Vaccine**, v. 26, p. 3998 - 4005, 2008.

TAVARES, M. B.; SILVA, B. M.; CAVALCANTE, R. C.M.; **SOUZA, R. D.**; LUIZ, W.B.; PACCEZ, J. D.; CROWLEY, P. J.; BRADY, L. J.; FERREIRA, L. C.S.; FERREIRA, R. C.C. Induction of neutralizing antibodies in mice immunized with an amino-terminal polypeptide of *Streptococcus mutans* P1 protein produced by a recombinant *Bacillus subtilis* strain. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 59, p. 131-142, 2010.

TAVARES, M. B.*; **SOUZA, R. D.***; LUIZ, W. B.; CAVALCANTE, R. C. M.; CASAROLI, C.; MARTINS E. G.; FERREIRA, R. C. C.; FERREIRA, L. C. S. *Bacillus subtilis* endospores at high purity and recovery yields: optimization of growth conditions and purification method. **Current Microbiology**, v. 66(3), p. 279-285, 2013.

* As autoras contribuíram igualmente para o desenvolvimento do trabalho.

SOUZA, R. D.; TAVARES, M. B.; LUIZ, W. B.; CAVALCANTE, R. C. M.; AMORIM, J. H.; BIZERRA, R. S.; MARTINS E. G.; FERREIRA, L. C. S. *Bacillus subtilis* spores as vaccine adjuvants: further insights into the mechanisms of action. **PLoS One**, v.9, n.1, e87454, p1-10, 2014.

TAVARES, M. B.; **SOUZA, R. D.**; PACCEZ, J. D.; LUIZ, W. B.; FERREIRA, E. L.; CAVALCANTE, R. C. M.; FERREIRA, R. C. C.; FERREIRA, L. C. S. Gut adhesive *Bacillus subtilis* spores as a platform for mucosal delivery of antigens. **Infection and Immunity**, v. 84, p. 1414-1423, 2014.

BOTTE, D. A. C.; **SOUZA, R. D.**; PIANTOLA, M. A.; ALVES, R. P. S.; FRANÇO SO JUNIOR, O. A.; FERREIRA, R. C. C. Microbiologia no ensino superior: "Adote uma Bactéria!" (e o Facebook®)! **Microbiologia in foco**, v. 23, p. 5-9, 2014.

9.1.3 - Depósito de Patente Nacional:

Sequência de ácido nucléico recombinante que codifica para os aminoácidos 39 a 512 da proteína P1 do *S. mutans*, proteína recombinante e seus usos na prevenção e controle da cárie dental. Protocolo No: 018110008382.

9.1.4 - Participações em Congressos, Simpósios e Reuniões Científicas:

Comunicações: 8 nacionais e 3 internacionais

Apresentação oral: 1 nacional.

9.1.5 - Experiência Acadêmica

Participação nas atividades da IV Mostra de Microbiologia, dirigida a estudantes de ensino fundamental e médio, promovida pela Coordenadoria de Cultura e Extensão do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, entre os dias 20 a 24 de outubro de 2008.

Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino - PAE no Instituto de Ciências Biomédicas.

Disciplina: Microbiologia Básica para o curso de Odontologia.

Período: Fevereiro à Abril de 2011.

Supervisora: Prof. Dr Rita de Cássia Café Ferreira.

Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino - PAE no Instituto de Ciências Biomédicas.

Disciplina: Microbiologia Básica para o curso de Farmácia- Bioquímica

Período: Agosto à Outubro de 2011.

Supervisor: Prof. Dr Luis Carlos de Souza Ferreira.

Elaboração do minicurso “Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas”, com duração de 04 horas, ministrado na XII Reunião Científica e I Encontro de Graduação do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, em Dezembro de 2012.

Elaboração do minicurso “Vacinas: da ideia à concepção”, com duração de 06 horas, ministrado no II Encontro de Graduação do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, em Dezembro de 2013.

9.1.6 - Participação em Cursos:

Curso teórico intitulado "Production of recombinant proteins in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*", ministrado pelo Prof. Dr. Wolfgang Schumann, no período de abril de 2006, no Departamento de Biotecnologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Curso teórico/prático intitulado “Novas Tecnologias em Vacinas Recombinantes”, realizado no período de 19 a 30 de julho de 2010 no CTCMol da Universidade Federal de São Paulo.

Curso prático intitulado “Fundamentos da Citometria de Fluxo”, realizado nos dias 26 e 27 de maio de 2011 no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Curso de Formação Técnico-Profissional de Perito Criminal (PC. 1/2012) realizado no período de 02 de janeiro a 18 de abril de 2014, na Academia de Polícia “Dr. Coriolano Nogueira Cobra”, Estado de São Paulo.

9.1.7 - Estágios:

Estágio no Laboratório de Patogenicidade Microbiana e Imunidade Inata, do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP/USP).
Período: Novembro de 2011

9.1.8 - Prêmios:

Prêmio de melhor trabalho de iniciação científica na área de Genética de Microrganismos, concedido pela Sociedade Brasileira de Genética ao trabalho intitulado “Modulation of Immune responses by listeriolysin O (LLO) expressed by recombinant *Bacillus subtilis* strains employed as live vaccine vectors”, apresentado durante o 53º Congresso Brasileiro de Genética realizado em Águas de Lindóia – SP, no período de 02 a 05 de Setembro de 2007.