LUANA RAPOSO DE MELO MORAES APS

**Efeito adjuvante de esporos de *Bacillus subtilis*
coadministrados a vacinas de DNA**

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

São Paulo
2013

LUANA RAPOSO DE MELO MORAES APS

**Efeito adjuvante de esporos de *Bacillus subtilis*
coadministrados a vacinas de DNA**

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

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

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

reprodução não autorizada pelo autor

Moraes-Aps, Luana Raposo de Melo.

Efeito adjuvante de esporos de *Bacillus subtilis* coadministrados a vacinas de DNA / Luana Raposo de Melo Moraes-Aps. -- São Paulo, 2013.

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

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Vacinas.

Versão do título para o inglês: Adjuvant effect of *Bacillus subtilis* spores co-administered with DNA vaccines.

1. Vacinas 2. DNA 3. Adjuvantes imunológicos 4. Esporos bacterianos I. Ferreira, Prof. Dr. Luís Carlos de Souza
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0136/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Luana Raposo de Melo Moraes-Aps.

Título da Dissertação: Efeito adjuvante de esporos de *Bacillus subtilis* coadministrados a vacinas de DNA.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

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 **95** nas fls. **106** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Luís Carlos de Sousa Ferreira**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*Efeito adjuvante dos esporos de *Bacillus subtilis* co-administrados a vacinas de DNA*" do qual participam o(s) alunos **Luana Raposo de Melo Moraes, Rafael Ciro Marques Cavalcante e a pesquisadora Mariana de Oliveira Diniz**, 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 **15.07.2011, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 18 de julho de 2011.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Dedico este trabalho

À minha mãe, Ana Lucia,

Pelo apoio e amor incondicional.

Ao Thiago, o amor da minha vida,

Pelo incentivo, companheirismo.

E por me dar um presente chamado Manuela.

E a Deus, meu Senhor e Provedor,

Por tornar meus sonhos possíveis e reais.

AGRADECIMENTOS

Os resultados apresentados nesta Dissertação não são fruto exclusivamente do meu esforço, mas também de diversas colaborações e parcerias. Esta é uma tentativa de agradecer aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste projeto. Meus sinceros agradecimentos:

À Profa. Dra. Rita de Cássia, pelo acolhimento, carinho e conselhos profissionais e pessoais. Pela alegria contagiante, amizade e por tornar meu dia-a-dia mais iluminado.

Ao Prof. Dr. Luís Carlos, pela orientação, confiança e estímulo. Pelas correções e conselhos e pelo espaço concedido para a realização deste trabalho.

À colega e companheira Mariana Diniz, pelas ideias inteligentes, conselhos, orientações, ensinamentos e paciência. Pela dedicação e amor ao trabalho que me incentivaram a prosseguir em momentos críticos desta jornada. Pela pessoa boa e generosa que é, sempre disposta a ajudar. Muito obrigada!

À Profa. Maria Elizabete Sbrogio, pelos ensinamentos no manuseio dos animais, fazendo parecer tudo tão fácil!

Aos colegas Rafael e Deni, pelos primeiros aprendizados no laboratório, dedicando grande parte de seu tempo para ensinar e me dar orientações durante vários meses.

Aos colegas do Grupo *Bacillus*: Rafael, Milene, Renata e Wilson, pelas dicas e sugestões, sempre prontos a colaborar.

Aos companheiros do grupo HPV/HIV: Mari Diniz, Bruna, Cariri, Natiely, Jamile, Marcinha e Mari Waligora, pela imensa ajuda em todos os aspectos deste trabalho, discussões de artigos e apoio todos os dias.

Aos amigos do LDV: Raíza, Mônica, Naína, Mari Cintra, Jaime, Rubens, Sara, Ewerton, Camila, Juliana, Roberto, Priscila e Eduardo pelos momentos de descontração e dicas para a realização deste trabalho.

A Loren e todos os técnicos que já passaram pelo laboratório, pelo excelente trabalho e ajuda.

Às alunas do Prof. Carlos Menck, Clarissa e Veridiana, pelo carinho e conselhos pessoais durante “9 meses” e após. À Clarissa, em especial, pela atenção e ajuda com os experimentos com luciferase.

Ao Luís, Juliane e Daniela pela dedicação ao biotério e aos animais de experimentação.

Às funcionárias Bete e Gisele da secretaria pela paciência e ajuda com dúvidas burocráticas durante todo o curso de mestrado.

Às minhas colegas do Instituto Butantan: Fabiana, Alessandra, Jackeline e Kaline pelo incentivo à realização desse curso.

Ao meu amor, Thiago, pela preciosa companhia, carinho e sabedoria em todos os momentos, bons e ruins. Pelo apoio financeiro nas horas difíceis e pela confiança em mim depositada. Agradeço a Deus por você fazer parte da minha vida.

À minha mãe, por ser além disso, uma confidente, companheira, parceira. Pela dedicação aos serviços gratuitos de motorista, cozinheira, babá, avó-mãe, essenciais para que eu desenvolvesse um bom trabalho, com muita alegria e tranquilidade.

À minha família, pai, irmã, madrastra, sogros e sogras, cunhados, primos e tios pelo imenso apoio emocional, que rechearam meus dias ao longo desses dois anos.

À minha filha, querida e tão amada, Manuela, fruto de muito amor e respeito. Nasceu no meio de experimentos, camundongos, qualificações e se tornou o resultado mais bonito e mais importante da minha vida.

E principalmente a Deus, pelo cuidado, atenção, amor e graça nestes vinte e seis anos. Por me orientar, guiar meus passos, e cumprir mais essa promessa em minha vida. Sem Ele, nada disso seria possível!

Este trabalho foi realizado sob orientação do Professor Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira, no Centro de Vacinas e Terapia Gênica (CEVAT – GENE 4), no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“(...) O que ninguém nunca viu nem ouviu, e o que jamais alguém pensou que podia acontecer, foi isso o que Deus preparou para aqueles que O amam.”

I Coríntios 2:9

RESUMO

MORAES-APS, L. R. M. **Efeito adjuvante de esporos de *Bacillus subtilis* coadministrados a vacinas de DNA.** 2013. 80 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Esporos de *Bacillus subtilis* podem ser utilizados como veículos vacinais capazes de expressar ou adsorver proteínas heterólogas em sua superfície. Estudos recentes indicaram que esporos de *B. subtilis* também conferem um forte efeito adjuvante para vacinas baseadas em proteínas purificadas administradas por via parenteral. Nesse cenário, o objetivo do presente projeto foi avaliar o papel adjuvante dos esporos de *B. subtilis* e viabilizar sua utilização como carregadores de vacinas de DNA pelo método da biobalística (*gene gun*). Nesta metodologia, os esporos foram utilizados como substitutos das micropartículas de ouro usualmente empregadas, mantendo a capacidade de transfecção de células eucarióticas *in vitro*, e produção de anticorpos específicos em camundongos C57BL/6 imunizados com o plasmídeo vacinal pgDE7h (que codifica para uma forma mutante da oncoproteína E7 do HPV-16). Além disso, esporos de *B. subtilis* foram capazes de ativar células dendríticas *in vitro* e, quando coadministrados a pgDE7h pela via intramuscular, conferiram um aumento significativo na proteção anti-tumoral de animais previamente transplantados com a linhagem tumoral TC-1 (que expressa a proteína E7 do HPV-16). Tal efeito adjuvante mostrou uma relação dose-dependente quanto à proteção anti-tumoral terapêutica e também quanto à ativação de linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺ E7-específicos. Em conclusão, os resultados representam uma contribuição inédita para o uso de esporos de *B. subtilis* como adjuvantes e consolidam essa nova e inovadora aplicação biotecnológica como carregadores para entrega de vacinas de DNA.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*. Adjuvantes. Vacinas de DNA. Biobalística. Micropartículas. HPV-16.

ABSTRACT

MORAES-APS, L. R. M. **Adjuvant effect of *Bacillus subtilis* spores co-administered with DNA vaccines.** 2013. 80 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Bacillus subtilis spores can be used as vaccine vehicles capable to display or adsorb heterologous proteins at the spore surface. Recent studies have indicated that spores of *B. subtilis* confer a strong adjuvant effect for vaccines based on purified proteins administered via parenteral routes. In this scenario, the objective of this project is to evaluate the adjuvant role of *B. subtilis* spores and to permit their use as carrier of DNA vaccine based on the biolistic method (*gene gun*). In this methodology, spores are employed as substitutes for gold microparticles to transfect eukaryotic cells *in vitro* and induce the production of specific antibodies in C57BL / 6 mice immunized with the vaccine plasmid pgDE7h (encoding a mutant form of the E7 oncoprotein of HPV-16). Additionally, spores of *B. subtilis* were capable to activate dendritic cells *in vitro* and, when co-administered intramuscularly with the pgDE7h vaccine vector, confer a significant increase of anti-tumor protection in animals previously inoculated with the TC-1 tumor cells that express the E7 protein of HPV-16. The adjuvant effect was measured both for the anti-tumor protection effect and for activation of CD8⁺IFN- γ ⁺E7-specific T lymphocytes as dependent on the amount of co-administered spores. In conclusion, the results represent a novel contribution to the use of spores of *B. subtilis* as adjuvants and consolidate the novel and innovative biotechnological application as carrier for delivery of DNA vaccines.

Keywords: *Bacillus subtilis*. Adjuvants. DNA vaccines. Biolistic. Microparticles. HPV-16.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de ação de vacinas de DNA após administração intramuscular	24
Figura 2 - Mecanismo de ação simplificado de vacinas de DNA entregues por biobalística e respostas imunes induzidas	28
Figura 3 - Esporos de <i>B. subtilis</i> 1012 visualizados por microscopia de contraste de fase	42
Figura 4 - Gráficos de dispersão de luz dinâmica (DLS) para determinação do diâmetro de partículas	43
Figura 5 - Análise do sobrenadante das reações de adsorção de DNA em esporos na presença de CTAB a 0,01%	46
Figura 6 - Análise do sobrenadante das reações de adsorção de DNA em esporos com fragmentos de DODAB BF a 2 mM	46
Figura 7 - Adsorção de CpG em esporos de <i>B. subtilis</i> na presença de DODAB BF a 2 mM	47
Figura 8 - Marcação de DNA plasmidial adsorvido na superfície dos esporos	48
Figura 9 - Cartuchos utilizados nas transfecções por biobalística	49
Figura 10 - Análise do potencial zeta de esporos de <i>B. subtilis</i> 1012 vivos (EV) ou inativados (EI) em diferentes etapas da reação de adsorção	50
Figura 11 - Avaliação do perfil do DNA plasmidial recuperado nos cartuchos de biobalística	52
Figura 12 - Imagens de bioluminescência de células eucarióticas COS7 transfectadas com pLuc por biobalística	53

Figura 13 - Imagens de bioluminescência de camundongos da linhagem C57BL/6 administrados pela via intradérmica com pLuc por biobalística	54
Figura 14 - Desenho esquemático do regime vacinal profilático realizado por biobalística	55
Figura 15 - Indução de células T CD8 ⁺ produtoras de IFN- γ E7 específicas em camundongos C57BL/6 imunizados por biobalística	56
Figura 16 - Determinação dos títulos de IgG total E7-específicos após imunização por biobalística	57
Figura 17 - Influxo celular após inoculação de esporos de <i>B. subtilis</i> por via intraperitoneal	59
Figura 18 - Análise da população de células dendríticas utilizadas no ensaio de ativação após exposição aos esporos de <i>B. subtilis</i>	61
Figura 19 - Secreção de citocinas pelas células dendríticas estimuladas <i>in vitro</i> após exposição aos esporos de <i>B. subtilis</i>	62
Figura 20 - Desenho esquemático do regime vacinal terapêutico realizado com esporos coadministrados a pgDE7h pela via intramuscular.....	64
Figura 21 - Indução de células T CD8 ⁺ produtoras de IFN- γ E7 específicas em camundongos C57BL/6 imunizados pela via intramuscular com os esporos de <i>B. subtilis</i>	64
Figura 22 - Ensaio de proteção terapêutica em camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 e inoculados pela via intramuscular com esporos de <i>B. subtilis</i>	65

Figura 23 - Indução de células T CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ E7-específicas em camundongos C57BL/6 imunizados pela via intramuscular com diferentes concentrações de esporos coadministrados a vacina de DNA.	67
Figura 24 - Ensaio de proteção terapêutica em camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 e inoculados pela via intramuscular com diferentes quantidades de esporos coadministrados a vacina de DNA	68
Figura 25 - Secreção de citocinas por esplenócitos de camundongos <i>naïve</i> estimulados <i>in vitro</i>	69
Figura 26 - Influxo celular após inoculação de diferentes quantidades de esporos de <i>B. subtilis</i> por via intraperitoneal	70
Figura 27 - Determinação dos títulos de IgG total específicos anti-E7, anti-gD e anti-esporos após imunização com diferentes concentrações de esporos	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo das reações de adsorção testadas com esporos purificados de <i>B. subtilis</i>	45
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Antigen presenting cell (célula apresentadora de antígeno)
AP	Activator protein (proteína ativadora)
AMP	Ampicilina
BTLA	B and T lymphocyte attenuator (atenuador de linfócitos B e T)
CD	Cluster of differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CIN	Cervical intraepithelial neoplasia (neoplasia intraepitelial cervical)
CMV	Citomegalovírus
CpG	Oligodeoxinucleotídeos contendo dinucleotídeos CG não metilados
CRT	Calreticulina
CTL	Cytotoxic T lymphocyte (linfócito T citotóxico)
DCs	Dendritic cells (células dendríticas)
DNA	Desoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
E	Early protein (proteína de expressão precoce)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
gD	Glicoproteína D
gDE7	Glicoproteína D fusionada geneticamente à proteína E7
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos)
HLA	Human leukocyte antigen (antígeno leucocitário humano)

HPV	Human papilloma virus (virus do papiloma humano)
HSP	Heat shock protein (proteína de choque térmico)
HSV	Herpes simplex virus (vírus herpes simplex)
HVEM	Herpes virus entry mediator
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Imunoglobulina
IgG1	Imunoglobulina de classe G e subclasse 1
IgG2a	Imunoglobulina de classe G e subclasse 2c
IL	Interleucina
L	Late protein (proteína de expressão tardia)
LB	Meio Luria-Bertani
mg	Miligramas
MHC	Major histocompatibility complex (complexo principal de histocompatibilidade)
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells (células supressoras de origem mielóide ou células mielóides-supressoras)
NF- κ B	Nuclear factor kappa B (Fator nuclear kappa B)
p/v	Peso sobre volume
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells (células mononucleares do sangue periférico)
PBS	Phosphatase buffered saline (tampão salina fosfato)
PE	Ficoeritrina
RNA	Ribonucleic acid (ácido ribonucléico)

SFB	Soro fetal bovino
Th	T helper
TNF	Tumor necrosis factor (fator de necrose tumoral)
Treg	Células T regulatórias
VLPs	Virus like particles (partículas semelhantes a vírus)
µg	Microgramas
µL	Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 OBJETIVOS.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Vetores vacinais.....	32
3.2 Linhagens celulares.....	33
3.3 Preparo dos esporos.....	33
3.4 Determinação do tamanho e potencial-zeta dos esporos.....	34
3.5 Adsorção de DNA plasmidial na superfície dos esporos.....	34
3.6 Microscopia de fluorescência de esporos impregnados com DNA plasmidial.....	35
3.7 Preparo dos cartuchos utilizados no <i>gene gun</i>.....	35
3.8 Quantificação de esporos/DNA plasmidial nos cartuchos	36
3.9 Detecção da atividade do gene repórter (<i>luc2</i>) em culturas de células e em camundongos após transfecção por <i>gene gun</i>.....	36
3.10 Detecção do influxo celular <i>in vivo</i> após inoculação por via intraperitoneal.....	37
3.11 Diferenciação e Ativação <i>in vitro</i> de células dendríticas.....	37
3.12 Imunização dos camundongos pelas vias intramuscular e intradérmica (biobalística) e desafio com as células tumorais.....	38
3.13 Ensaio de marcação intracelular de citocinas (<i>Intracellular Cytokine Staining</i> - ICS).....	39
3.14 Avaliação do perfil de citocinas por citometria de fluxo (<i>Cytometric Bead Array</i> - CBA).....	39
3.15 Resposta de anticorpos séricos em animais imunizados por meio do ensaio de ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)....	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 Utilização dos esporos de <i>B. subtilis</i> como micropartículas carregadoras para biobalística.....	42
4.1.1 Caracterização biofísica dos esporos.....	42
4.1.2 Padronização do protocolo de adsorção de DNA à superfície dos esporos.....	44

4.1.3 Padronização do procedimento de preparo dos cartuchos utilizados na biobalística.....	48
4.1.4 CTAB versus DODAB BF: Análise do perfil de adsorção de DNA plasmidial à superfície dos esporos.....	50
4.1.5 Transfecções <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> com o gene repórter codificando luciferase (<i>luc2</i>) em cartuchos preparados com esporos.....	53
4.1.6 Imunização de camundongos C57BL/6 com gene gun.....	55
4.2 Esporos de <i>B. subtilis</i> como adjuvantes vacinais.....	58
4.2.1 Determinação do perfil de células recrutadas no local de inoculação de esporos de <i>B. subtilis</i>.....	58
4.2.2 Ativação <i>in vitro</i> e perfil de citocinas produzidas por células dendríticas estimuladas com esporos de <i>B. subtilis</i>.....	60
4.2.3 Efeito adjuvante de esporos de <i>B. subtilis</i> coadministrados ao plasmídeo vacinal por via parenteral.....	63
4.2.4 Relação dose-efeito de esporos de <i>B. subtilis</i>.....	65
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
6 CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

Adjuvantes são componentes fundamentais na composição de qualquer formulação vacinal, particularmente em vacinas de DNA, que apresentam baixa imunogenicidade. Em geral, os primeiros testes clínicos com vacinas de DNA não demonstraram altos níveis de imunidade em seres humanos, embora tenham contribuído para a confirmação da segurança dessa plataforma vacinal. Contudo, novas modificações e melhorias devolveram otimismo quanto a essa tecnologia vacinal, dentre elas o uso de novos adjuvantes e a possibilidade de utilizar diferentes métodos de entrega.

Vacinas de DNA consistem na clonagem de antígenos (frequentemente associados a tumores) e fatores imuno-estimulatórios adicionais em um plasmídeo bacteriano a jusante de um promotor eucariótico apropriado para uma expressão forte e estável. Elas são internalizadas por células apresentadoras de antígeno ou mesmo células do tecido através da interação com a membrana plasmática até atingirem o núcleo. Podem induzir respostas anti-tumorais eficazes contra várias células malignas e proporcionam uma atraente estratégia de vacinação uma vez que não provocam resposta imune antivetorial, possibilitando administrações repetidas que podem ser necessárias para atingir e manter a resposta imune desejada. Além disso, as vacinas de DNA são simples, seguras, estáveis, fáceis de serem produzidas em larga escala e capazes de proporcionar a indução de resposta imune humoral e citotóxica, estimulando também a geração de memória imunológica (Figura 1).

Figura 1 - Mecanismo de ação de vacinas de DNA após administração intramuscular

Células musculares transfectadas produzem o antígeno codificado no plasmídeo. O antígeno é expresso na superfície de células contendo MHC I e apresentada a células T CD8⁺ e CD4⁺ (imunidade celular). O antígeno também pode ser excretado pelo músculo e fagocitado por células apresentadoras de antígeno (APC), geralmente células dendríticas, linfócitos B (imunidade humoral). Uma pequena proporção da vacina de DNA é captada diretamente por APCs e o antígeno codificado pode ser processado e apresentado de forma endógena.
 Fonte: modificado de Ahmad et al. (2012)

Nos últimos três anos, quatro vacinas de DNA foram licenciadas para uso veterinário, sendo uma delas para o tratamento de melanoma em cães – primeira imunoterapia aprovada para câncer. Muitos antígenos relacionados a câncer são alvos interessantes de imunoterapias. Em modelo murino, vacinas de DNA têm sido direcionadas a uma ampla variedade de tumores, na maioria das vezes induzindo resposta imune celular específica eficiente. Em ensaio clínico, há também indicações de respostas imunológicas induzidas por vacinas de DNA em pacientes com melanoma e câncer de próstata, sugerindo benefícios clínicos em alguns casos relatados (KUTZLER; WEINER, 2008).

Outros estudos demonstraram que vacinas de DNA podem ser empregadas na imunoterapia do câncer do colo de útero, sendo essencial a fusão de genes das oncoproteínas do HPV a genes de proteínas com propriedades imuno-moduladoras para ativação de respostas citotóxicas CD8⁺-dependentes (HUNG; MONIE; ALVAREZ, 2007; KIM et al., 2004). Duas vacinas de DNA que codificam proteínas híbridas encontram-se atualmente em ensaio clínico e codificam a proteína E7

fusionada à proteína HSP70 de *Mycobacterium tuberculosis* (pNGVL4a-Sig/E7(detox)/HSP70) ou à CRT (calreticulina) (pNGVL4a/E7(detox)/CRT) e são inoculadas pela via intramuscular ou intradérmica, respectivamente (MA et al., 2010). Outra formulação vacinal em ensaios clínicos, VGX-3100, utiliza a eletroporação *in vivo* como método de administração e codifica as proteínas E6 e E7 dos HPV-16 e -18. Em pacientes diagnosticadas com CIN2/3 e que passaram por tratamento cirúrgico, essa vacina se mostrou segura e capaz de induzir resposta imune do tipo celular em 70% das pacientes. A vacina de DNA que está em estágio mais avançado de desenvolvimento em ensaios clínicos, chamada ZYC101a, utiliza o método de entrega de DNA microencapsulados. Essa vacina codifica epítomos HLA-A2 restritos de E6 e E7 dos HPV-16 e -18 e em ensaio clínico de fase II em pacientes com câncer cervical de alto grau demonstrou promover a redução das lesões na maioria (70%) das pacientes com menos de 25 anos (GARCIA et al., 2004).

As proteínas E6 e E7 são, frequentemente, alvos de estratégias vacinais contra tumores associados ao HPV por induzirem uma proliferação celular acelerada e desordenada resultando em lesões epiteliais pré-cancerígenas, que podem evoluir para o câncer invasivo em alguns casos (VILLA et al., 2006). Tais proteínas fazem parte do grupo de proteínas codificadas por genes de expressão precoce e atuam no processo de malignização celular através de interação com um vasto repertório de proteínas, promovendo bloqueio de apoptose, proliferação celular e instabilidade cromossômica. O mecanismo envolvido na oncogênese está primeiramente associado com as proteínas E6 e E7. Embora a interação seja complexa, E6 atua principalmente no aumento da degradação de p53. E7 causa o rompimento do complexo E2F/pRb, ativando E2F, um importante fator de transcrição que ativa genes envolvidos em síntese de DNA e progressão do ciclo celular. E6 ainda exerce um papel importante na ativação de telomerase, uma enzima responsável pelo alongamento dos telômeros, resultando no aumento da proliferação das células epiteliais. E7 também está envolvida no bloqueio da apoptose. Já as proteínas de expressão tardia L1 e L2 são responsáveis pela montagem do virion e empacotamento do DNA e compõem o capsídeo viral.

Um outro exemplo de estratégia vacinal promissora contra tumores induzidos por HPV envolvendo E6 e E7 foi desenvolvida no Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas (LDV) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP). Tal estratégia é baseada em um plasmídeo que codifica a proteína E7

do HPV-16 fusionada à glicoproteína D (gD) do vírus herpes simplex tipo 1 (HSV) contendo códons otimizados para a expressão em células humanas, nomeado de pgDE7h (DINIZ; FERREIRA, 2010). No LDV, este mesmo grupo desenvolveu outras vacinas terapêuticas contra tumores induzidos por HPV baseadas na expressão de proteínas híbridas, resultado da fusão da gD a oncoproteínas do HPV-16 (DINIZ et al., 2010; DINIZ; FERREIRA, 2011; LASARO et al., 2005). A gD é um componente estrutural do envelope do HSV e, depois de expressa, localiza-se na membrana plasmática de células infectadas. A gD possui uma região transmembrana e, desta forma, as oncoproteínas do HPV-16 a ela fusionadas são expressas no meio extracelular (ancoradas), reduzindo os riscos de malignização das células transfectadas. Esse direcionamento celular proporcionado pela gD também pode contribuir para um aumento no reconhecimento de proteínas a ela fusionadas por células do sistema imune. Além disso, foi demonstrado que a proteína gD é capaz de gerar sinais estimulatórios para as células do sistema imune por meio da ativação de NF- κ B (CHEUNG et al., 2009; POLLARA et al., 2004). Testes em modelo murino mostraram que tais vacinas são capazes de ativar células T CD8⁺E7-específicas e gerar proteção anti-tumoral em camundongos tratados terapeuticamente com as vacinas (utilizando a linhagem tumoral TC-1 capaz de expressar as proteínas E6 e E7 do HPV-16 que forma tumores em camundongos C57BL/6). Formulações aprimoradas pela coadministração de vetores que codificam citocinas resultaram em um aumento expressivo do efeito terapêutico anti-tumoral quando inoculadas pela via intramuscular (DINIZ et al., 2010), e de forma semelhante pela via intradérmica, utilizando o método da biobalística (DINIZ; FERREIRA, 2011; DINIZ et al., 2013).

As vacinas de DNA são frequentemente administradas por injeção direta do DNA pela via intramuscular ou pela via intradérmica utilizando o método da biobalística (HASSETT; WHITTON, 1996). As duas vias de inoculação têm se mostrado eficientes na geração de resposta humoral e celular, entretanto, a via intradérmica apresenta maior número de células apresentadoras de antígeno (APCs) no local da inoculação. Outras vantagens de grande importância clínica são a redução significativa da dose utilizada e o aumento da eficiência de transfecção plasmidial.

A técnica da biobalística, também conhecida por bombardeamento de partículas, foi descrita inicialmente em 1987 (SANFORD et al., 1987). O método

consiste na aceleração de micropartículas que atravessam a parede celular ou a membrana plasmática, de forma não letal, carregando substâncias adsorvidas, como DNA, RNA ou proteínas para o interior da célula (FERREIRA et al., 2004). O processo não necessita de um pré-tratamento do tecido a ser transfectado e requer quantidades muito pequenas da substância de interesse. (KLEIN et al., 1987). No caso de transfecção plasmidial, podem ser utilizados microprojéteis de ouro ou tungstênio, com diâmetro em torno de 1 μm , nos quais são precipitadas as moléculas de DNA. O tipo de aparelho usado para acelerar as micropartículas envolvidas pelo DNA pode ter propulsão a ar, pólvora, gás hélio ou eletricidade (FERREIRA et al., 2004). Atualmente, para vacinas de DNA, o método usualmente empregado utiliza microesferas de ouro impregnadas com DNA plasmidial que são administradas através de uma pistola (*gene gun*). O *gene gun* é acoplado a um cilindro de gás hélio e, sob alta pressão, direciona as partículas para as células da pele, incluindo células Langerhans, um dos tipos de células apresentadoras de antígeno mais abundantes neste tecido (Figura 2) (BARRY; LAI; JOHNSTON, 1995).

Figura 2 - Mecanismo de ação simplificado de vacinas de DNA entregues por biobalística e respostas imunes induzidas

A proteína ou peptídeo codificado no plasmídeo administrado por *gene gun* é apresentado pela via de MHC I, levando à ativação e proliferação de linfócitos T CD8⁺ específicos, podendo ser apresentado também por via de MHC classe II quando ocorre o fenômeno de *cross-presentation*. Tal mecanismo pode também gerar uma resposta humoral a partir da ativação de linfócitos T CD4⁺ levando a um balanço de respostas dos tipos Th1 e Th2. O uso de micropartículas de ouro impregnadas com DNA induz aumento da estabilidade e requer uma dose significativamente menor do plasmídeo em relação à administração intramuscular.

Fonte: Modificado de Flores et al. (2012)

Como estratégia já muito bem consolidada na biobalística, para a impregnação das micropartículas com plasmídeos de interesse utilizam-se agentes catiônicos capazes de induzir a protonação das partículas inertes, como o ouro, possibilitando dessa maneira a interação com o DNA, classicamente considerado uma molécula de carga negativa. Neste contexto, esporos de *Bacillus subtilis* mostram-se como micropartículas promissoras como carregadores vacinais. Estudos recentes observaram que a superfície dos esporos apresenta propriedades hidrofóbicas e é carregada negativamente, promovendo uma plataforma adequada para adsorção de proteínas antigênicas sob condições ligeiramente ácidas de pH, podendo então ser entregues sob a forma de vacinas particuladas pela via parenteral (HUANG et al., 2010). Neste estudo, camundongos das linhagens Balb/c e C57BL/6 imunizados por via oral e nasal com antígenos adsorvidos na superfície dos esporos apresentaram

resposta celular do tipo Th1 com altos níveis de IgG2a e IFN- γ em comparação aos controles utilizados, sugerindo sua utilização como veículos de entrega de moléculas terapêuticas. Resultados semelhantes foram obtidos adsorvendo partículas virais a esporos inativados de *B. subtilis* (SONG et al., 2012). Além disso, os esporos de *B. subtilis* também têm recebido destaque na área de vacinologia por conferirem efeito adjuvante após administração por diferentes vias, na forma de micropartículas, quando associados a antígenos. Barnes e colaboradores (2007) observaram que, em camundongos, esporos coadministrados a antígenos solúveis pelas vias intranasal e subcutânea foram capazes de aumentar de modo significativo os níveis de IgG1 e IgG2a e células T CD8⁺ e CD4⁺ produtoras de IFN- γ , promovendo um balanço (Th1 e Th2) na resposta imune induzida. Outros trabalhos mostram que a administração de esporos, sem qualquer antígeno vacinal, é capaz de gerar uma atividade imuno-estimulatória a partir da interação com receptores *toll-like* (TLR), evidenciando dessa maneira um papel fundamental na geração de resposta imunológica como adjuvantes vacinais (LIANG et al., 2013), e podendo ser facilmente aplicados na imunoterapia contra o câncer cervical causado pelo HPV.

O HPV está relacionado com aproximadamente 99% dos casos de câncer cervical. Em humanos, mais de 200 tipos de HPV já foram descritos e cerca de 40 apresentam tropismo para infectar a mucosa do trato anogenital. Os vírus com este tropismo podem ser divididos nos tipos de baixo e alto risco, de acordo com sua presença em lesões de alto grau e tumores malignos (VILLA et al., 2006). Entre os HPVs de baixo risco, HPV-6 e HPV-11 são os mais frequentemente associados a condilomas genitais. Entre os de alto risco, HPV-16 e HPV-18 destacam-se por serem responsáveis por cerca de 70% dos casos de câncer do colo do útero, sendo o HPV-16 a causa de pelo menos 55% dos casos deste tipo de câncer, podendo ser considerado o principal agente etiológico da doença (BOSCH et al., 1995). A infecção por vírus HPV é frequente entre mulheres sexualmente ativas, com uma prevalência entre 15 a 40% (BOSCH, 2003). Estima-se que, até atingir 50 anos de idade, pelo menos 80% das mulheres serão infectadas por algum tipo de HPV de alto risco em algum momento de suas vidas (BASEMAN; KOUTSKY, 2005) o que faz dela a infecção sexualmente transmissível mais comum (EBRAHIM; MCKENNA; MARKS, 2005).

A resposta imune do hospedeiro elimina a maioria das infecções por HPV e lesões induzidas pelo vírus, podendo ser detectadas respostas imunes dos tipos

humoral e celular contra antígenos de HPV (JENSON; KURMAN; LANCASTER, 1991; HÖPFL et al., 2000). O desenvolvimento de lesões e tumores relacionados ao HPV-16 foi associado à resposta imune celular defectiva contra as proteínas E6 e E7 (DE JONG et al., 2004). Estudos demonstraram que a indução de células T CD4⁺ e CD8⁺ que reconhecem epítomos dessas proteínas, infiltradas nos tumores e presentes no sangue dos pacientes, está associada à proteção contra infecções persistentes e regressão de lesões e que a ausência de indução de células T CD8⁺ citotóxicas (CTL) pode ser notada em pacientes com carcinoma cervical (BONTKES et al., 2000).

Vacinas terapêuticas capazes de induzir forte resposta celular citotóxica, nesse caso, facilitariam a redução da mortalidade e morbidade de neoplasias associadas ao HPV sendo uma alternativa eficiente ao tratamento tradicional baseado em processos cirúrgicos, radioterápicos e quimioterápicos. Tais tratamentos são altamente invasivos e não agem especificamente sobre as células tumorais, causando morte ou remoção de tecidos saudáveis e efeitos colaterais indesejáveis. Além disso, os tratamentos hoje disponíveis são dispendiosos, podendo custar entre 7 e 24 mil dólares por paciente, dependendo do estágio de desenvolvimento do câncer. Ainda, países em desenvolvimento muitas vezes não têm condições financeiras ou estruturais para oferecer exames preventivos ou o tratamento ideal junto ao sistema público de saúde, contribuindo com a alta incidência de morte por câncer cervical nesses locais. Por ano, são diagnosticados cerca de 500 mil novos casos e 270 mil mortes no mundo, sendo aproximadamente 80% delas em países em desenvolvimento, com uma estimativa de quase 20.000 novos casos no Brasil (BORSATTO; VIDAL; ROCHA, 2011; WHO, 2009).

Nesse cenário, a presente dissertação de mestrado teve como objetivos centrais viabilizar o uso dos endosporos da bactéria *B. subtilis* como substitutos das micropartículas de ouro na administração de vacinas de DNA pela via intradérmica por biobalística (*gene gun*) e consolidar sua aplicação como adjuvantes vacinais em relação ao plasmídeo vacinal pgDE7h. As formulações vacinais foram avaliadas em modelo murino quanto à resposta imune celular e humoral induzidas e quanto à capacidade de gerar proteção anti-tumoral preventiva ou terapêutica por meio de implante de células transformadas que expressam as oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 (linhagem tumoral TC-1).

2 OBJETIVOS

- Viabilizar a utilização de esporos de *B. subtilis* como micropartículas carregadoras de vacinas de DNA na administração intradérmica por biobalística;
- Avaliar as propriedades adjuvantes dos esporos de *B. subtilis* quando coadministrados a uma vacina de DNA terapêutica pela via intramuscular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Vetores vacinais

O plasmídeo que expressa a proteína E7 de HPV-16 fusionada à gD de HSV-1 foi construído após clonagem do gene sintético que codifica a proteína híbrida gD com a sequência gênica otimizada para códons de humanos (pgDE7h). Além disso, na sequência de E7 presente no gene sintético foram realizadas duas mutações pontuais que nocauteiam a atividade oncogênica da proteína via interação com a proteína pRb. Tais mutações consistiram na troca de uma cisteína por uma glicina na posição 24 de E7 e de um ácido glutâmico por uma glicina na posição 26 de E7 e foram descritas anteriormente (TRIMBLE et al., 2003). O gene sintético foi desenhado com as sequências dos sítios de *Bgl* II e *Pst* I nas extremidades, que foram os sítios utilizados para subsequente clonagem da sequência no plasmídeo pUMVC3 (Aldevron, EUA) que possui gene que codifica resistência à canamicina e promotor de CMV.

O plasmídeo que expressa a proteína luciferase (pLuc) foi construído após clonagem do gene sintético da luciferase (*luc2*) – extraído do vetor pGL4 (Promega) – nos sítios de *Bam* HI e *Xba* I do plasmídeo pcDNA3.0 (Invitrogen). Este possui gene que codifica resistência a ampicilina/neomicina e promotor de CMV.

A obtenção dos plasmídeos, para serem usados nas transfecções/imunizações foi realizada através de propagações em larga escala em linhagens de *Escherichia coli* DH5 α transformadas com os diferentes vetores, em meio LB suplementado com ampicilina (100 μ g/mL) ou canamicina (50 μ g/mL), seguido da purificação dos plasmídeos utilizando o kit de purificação de plasmídeos de “Giga Prep” (QIAGEN Endo Free Plasmid Giga, QIAGEN), seguindo instruções do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro a 260 nm e confirmadas por inspeção visual em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo, utilizando para comparação fragmentos de DNA padrões com concentrações conhecidas (Invitrogen). Os plasmídeos foram mantidos a –20 °C até o momento de sua utilização.

3.2 Linhagens celulares

A linhagem celular tumoral TC-1 (LIN et al., 1996) é derivada de células primárias do epitélio pulmonar de camundongos C57BL/6 transformadas com c-Ha-ras e os genes de E6 e E7 do HPV-16 (gentilmente cedida pelo Dr. T.C. Wu, Universidade Johns Hopkins, EUA). As células TC-1 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sódio, 2 mM aminoácidos não essenciais, 10 mM tampão HEPES, 50 U/mL penicilina/streptomicina, 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas a 37 °C e 5% de CO₂. No dia do desafio tumoral as células foram tratadas com tripsina, lavadas duas vezes e suspensas em meio sem soro na concentração apropriada para a inoculação.

A linhagem celular COS7 é do tipo fibroblástica, derivada do tecido de rim do macaco verde africano e obtida a partir de células CV-1 (transformadas por um mutante do vírus SV-40). As células COS7 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sódio, 2 mM aminoácidos não essenciais, 10mM tampão HEPES, 50 U/mL penicilina/streptomicina, 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas a 37 °C e 5% de CO₂ até sua utilização. 5x10⁶ células por poço foram cultivadas em placas de 6 poços 48 h antes da transfecção e após, mantidas a 37 °C e 5% de CO₂ em meio DMEM 2% SFB.

3.3 Preparo dos esporos

A esporulação de *B. subtilis* foi realizada por meio da exaustão de nutrientes com o meio Foerster (FOERSTER; FOSTER, 1966) através do protocolo modificado de Tavares e colaboradores (2013). As culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min após 7 dias de esporulação e sujeitas a três lavagens com água destilada. Por fim, os esporos foram ressuspensos em água e incubados por 1 h a 68 °C. Os esporos viáveis foram visualizados no microscópio digital EVOS® (AMG) e titulados para determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC/ml). Os esporos inativados utilizados neste trabalho foram obtidos a partir da autoclavação (121 °C/15 min) dos esporos viáveis preparados por meio da metodologia anteriormente descrita e comprovados quanto à inativação por meio de testes de crescimento em cultura com meio LB.

3.4 Determinação do tamanho e potencial-zeta dos esporos

A determinação do diâmetro médio dos esporos foi realizada através da curva de distribuição de tamanho obtida pela técnica de DLS (*Dynamic Light Scattering*). O potencial-zeta, carga elétrica total da superfície dos esporos, foi obtido a partir da mobilidade eletroforética, medida pela frequência da luz espalhada (*Electrophoretic Light Scattering*, ELS). As amostras foram suspensas em 1 mL de água destilada estéril e as leituras feitas no equipamento ZetaPlus Zeta Potential Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, USA).

3.5 Adsorção de DNA plasmidial na superfície dos esporos

Para a padronização da nova metodologia de adsorção de plasmídeos foram desenvolvidas três etapas. A primeira consistiu no tratamento dos esporos com diferentes reagentes catiônicos, foram eles: CTAB, brometo de cetiltrimetilamônio; DODAB, brometo de dioctadecildimetilamônio, na forma de fragmentos de bicamada lipídica BF (do inglês *bilayer fragments*); espermidina ou cloreto de cálcio. Em seguida, realizou-se a adsorção propriamente dita adicionando a solução de DNA aos esporos tratados e lavados para remoção do reagente residual. Por fim, a suspensão contendo esporos e DNA foi centrifugada para obtenção do precipitado – correspondente aos esporos com DNA adsorvido – e do sobrenadante, utilizado para mensurar a quantidade de DNA remanescente, e consequentemente, a adsorvida. Para a primeira etapa, esporos (5×10^8) foram ressuspensos em 1 mL de reagente e permaneceram em agitação moderada por 60 min, à temperatura ambiente (25 °C). Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 min e o precipitado lavado uma vez com 1 mL de água destilada. Ao final da lavagem, iniciou-se a segunda etapa, onde o precipitado foi ressuspenso em solução aquosa contendo o DNA plasmidial na concentração de interesse, totalizando um volume igual a 125 µL. A mistura permaneceu a 25 °C ou 4 °C durante 1 h ou 6 h, agitando-se gentilmente a cada 15 min ou apenas homogeneizada (sem incubação). A suspensão foi então centrifugada para obtenção do precipitado contendo os esporos com o plasmídeo adsorvido em sua superfície. O sobrenadante foi armazenado, quando necessário, para posterior análise por eletroforese em gel de agarose e os volumes de reação ajustados proporcionalmente, segundo quantidades

de interesse de esporos ou do plasmídeo em questão. Os fragmentos de bicamada de DODAB (DODAB BF) foram produzidos por meio de sonicação por 20 min, a 20% de potência do sonicador de uma solução 2 mM preparada a partir do pó de DODAB.

3.6 Microscopia de fluorescência de esporos impregnados com DNA plasmidial

Esporos (5×10^8) de *B. subtilis* foram impregnados com 1 μ g DNA plasmidial (pgDE7h), segundo metodologia descrita anteriormente. Em seguida, foram incubados por 30 min a temperatura ambiente com solução de DAPI (4'6'-diamidino-2-fenilindol) a 2 μ g/mL. As suspensões de esporos foram lavadas e ressuspensas em água, adicionadas em lâminas para microscopia e fixadas por calor. As imagens foram visualizadas no microscópio digital EVOS® (AMG). O controle negativo do experimento utilizou a mesma quantidade de esporos, sob as mesmas condições de marcação, porém sem o plasmídeo vacinal adsorvido.

3.7 Preparo dos cartuchos utilizados no *gene gun*

Para a administração por biobalística, o plasmídeo de interesse foi adsorvido aos esporos de *B. subtilis* de acordo com o protocolo padronizado de adsorção. Ao final da reação, o precipitado foi ressuspense em solução de PVP (polivinilpirrolidona) 0,05 mg/mL em etanol 100% e adicionado ao tubo de Tefzel® com o auxílio de uma seringa, onde permaneceu, fechado, por aproximadamente 16 h a 25 °C. Ao término da incubação, o líquido contendo PVP foi descartado ou armazenado quando necessário para posterior quantificação dos esporos (perda). O tubo contendo a camada aderida de esporos foi seco com gás hélio e cortado para obtenção dos cartuchos com o cortador de tubos adquirido da Biorad. Proporcionalmente, para o preparo de dez cartuchos utilizou-se 10 cm de tubo, 5×10^9 esporos e 10 μ g de plasmídeo adsorvido em sua superfície. Os cartuchos preparados foram armazenados sob refrigeração a 4 °C, -20 °C ou -80 °C para testes de quantificação de esporos.

Para a administração por biobalística com as micropartículas de ouro, utilizou-se protocolo padronizado pelo fabricante (BIORAD). Para o preparo de 10 cartuchos, 5 mg de ouro (aproximadamente 5×10^8 partículas de 1 μ m) foram impregnados com

10 µg de DNA plasmidial através de solução de espermidina 0,05 M e CaCl₂ 1 M e, após sucessivas lavagens com etanol 100%, foram ressuspensos em 600 µL de solução de PVP 0,05 mg/mL e adicionados no tubo de Tefzel® com o auxílio de uma seringa, onde permaneceram a 25 °C por 10 min. O líquido remanescente contendo PVP foi então descartado e o tubo seco com gás hélio para obtenção dos cartuchos, os quais permaneceram a 4 °C até o momento de sua utilização.

3.8 Quantificação de esporos/DNA plasmidial nos cartuchos

Para mensurar a quantidade de DNA plasmidial adsorvida por cartucho, utilizou-se protocolo descrito no manual do fabricante (BIORAD). Um cartucho foi colocado em um tubo de microcentrifuga juntamente com 100 µl de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) e levado à agitação vigorosa até desprendimento de todo o conteúdo presente (esporos ou ouro). O material foi centrifugado por 10 min (esporos) ou 15 s (ouro). O sobrenadante foi analisado por eletroforese em gel de agarose e o precipitado quantificado para determinação do número de esporos efetivamente obtido por cartucho.

3.9 Detecção da atividade do gene repórter (*luc2*) em culturas de células e em camundongos após transfecção por *gene gun*

A fim de comprovar a utilização de esporos como micropartículas carregadoras para biobalística, células eucarióticas COS7 dispostas em monocamada e a 80% de confluência foram transfectadas com um cartucho contendo esporos ou ouro e 1 µg do plasmideo pLuc codificando o gene repórter. O *gene gun* foi colocado o mais próximo possível à cultura e aplicada uma pressão de hélio igual a 100 psi. Em seguida foram adicionados 5 mL de meio de cultura e as células incubadas por 48 h a 37 °C e 5% CO₂. Os resultados de bioluminescência foram obtidos após adição de luciferina (Promega) no meio de cultura, na concentração final de 150 µg/mL, e visualização no equipamento IVIS® Spectrum (Caliper).

Para detecção da atividade da luciferase *in vivo*, foram utilizados camundongos C57BL/6, machos, de 6-8 semanas. Para cada animal foram

administrados um ou dois cartuchos sob alta pressão de gás hélio (500 psi) na região abdominal depilada. Os resultados de bioluminescência foram obtidos após inoculação por via intraperitoneal de luciferina (Promega), na concentração de 150 mg/kg de peso corpóreo, e visualização no equipamento IVIS® Spectrum (Caliper) 48 h após a transfecção.

3.10 Detecção do influxo celular *in vivo* após inoculação por via intraperitoneal

Este experimento foi realizado na tentativa de se observar efeitos imuno-estimuladores dos esporos quando inoculados pela via intraperitoneal em camundongos C57BL/6 nãive. Cada animal foi inoculado com 500 ng de LTIIa (toxina termolábil de *Escherichia coli*), esporos vivos ou inativados (5×10^8) em 100 μ L de solução de PBS. A LTIIa foi utilizada para fins de comparação uma vez que é considerada um adjuvante da mesma classe dos esporos de *B. subtilis*. Após 24 h da inoculação, a cavidade peritoneal foi lavada com 10 mL de PBS contendo EDTA 2mM e as células ressuspensas em PBS 2% SFB após centrifugação a 1300 rpm/5 min. As mesmas foram então incubadas por 30 min a 4 °C com os anticorpos anti-Gr1⁺, anti-CD11b⁺, anti-CD11c⁺, anti-CD19⁺, anti-F4/80⁺ e anti-Ly6C⁺ conjugados com diferentes fluorocromos (BD Biosciences). As células foram ressuspensas em PBS 2% SFB e examinadas por citometria de fluxo utilizando o aparelho FACS Canto (BD Biosciences). Os dados foram analisados com o auxílio do programa FlowJo para a determinação das porcentagens de células CD11c⁺, Gr1⁺CD11b⁺, CD19⁺ e F4/80⁺Ly6C⁺ do total de células recuperadas do lavado intraperitoneal.

3.11 Diferenciação e ativação *in vitro* de células dendríticas

Para obtenção das células dendríticas realizou-se o procedimento de diferenciação *in vitro* com meio de cultura contendo GM-CSF e IL-4 (ZANONI et al., 2009) a partir de células da medula óssea de camundongos da linhagem C57BL/6. Células obtidas de fêmures de animais adultos nãive foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 95 μ M β -mercaptoetanol, 2 mM aminoácidos não essenciais, 50 U/mL penicilina/streptomicina, 30 ng/mL GM-CSF, 10 ng/mL IL-4, 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas a 37 °C e 5% de CO₂. Nos dias 4 e 7 foram adicionados 5 mL do meio condicionado, e no dia 9, as células foram

utilizadas para o ensaio de ativação e o sobrenadante da cultura utilizado no teste de avaliação do perfil de citocinas, CBA (*Cytometric Bead Array*).

Para o ensaio de ativação, 5×10^4 células foram mantidas em meio RPMI 10% SFB por 16 h e estimuladas com PBS, 1 μ g DNA (pgDE7h), esporos vivos ou inativados (5×10^8) durante 24 h. Após este período, as células foram incubadas por 30 min a 4 °C com os anticorpos anti-CD11c⁺, anti-CD40⁺, anti-CD80⁺ e anti-CD86⁺ conjugados com diferentes fluorocromos (BD Biosciences). As células foram ressuspensas em PBS e examinadas por citometria de fluxo utilizando o aparelho FACS Calibur (BD Biosciences). Os dados foram analisados com o auxílio do programa FlowJo para a determinação das porcentagens de células CD11c⁺, CD40⁺, CD80⁺ ou CD86⁺ do total de células estimuladas.

3.12 Imunização dos camundongos pelas vias intramuscular e intradérmica (biobalística) e desafio com as células tumorais

Os experimentos de imunização foram realizados com camundongos machos C57BL/6 com idade entre 8-10 semanas adquiridos do Biotério de Experimentação do Departamento de Parasitologia da USP e manuseados segundo as normas estabelecidas pela comissão de ética do ICB-USP. Foram utilizados cinco animais para cada grupo de imunização

A imunização pela via intramuscular foi feita utilizando 25 ou 40 μ g de DNA diluído em 100 μ L de PBS através de inoculação nos músculos tibial anterior de cada pata (50 μ L por pata).

A imunização utilizando o processo de biobalística foi realizada através de uma pistola acoplada a um cilindro de hélio de acordo com as instruções do fabricante (Biorad). Ouro e esporos de *B. subtilis*, em quantidades padronizadas, foram revestidos pelo plasmideo vacinal. As micropartículas com o DNA foram aceleradas por uma alta pressão de gás hélio (500 psi) e entregues à região abdominal depilada do animal por biobalística com regime de duas doses com uma semana de intervalo entre as doses (2 ou 4 μ g de DNA/animal). A inoculação das células tumorais TC-1 foi realizada por via subcutânea, na concentração de $7,5 \times 10^4$ /animal suspensas em 100 μ L de meio sem soro e inoculadas na região dorsolateral do animal uma semana depois da última imunização no regime

profilático e três dias após o início do protocolo vacinal terapêutico. O acompanhamento da evolução dos tumores nos ensaios de regressão tumoral foi feito três vezes a cada semana por um período de 60 dias. Os tumores, quando presentes, foram medidos com o auxílio de um paquímetro e os animais que apresentaram tumores maiores que 1,5 cm de diâmetro foram sacrificados.

3.13 Ensaio de marcação intracelular de citocinas (*Intracellular Cytokine Staining* - ICS)

A marcação de IFN- γ intracelular foi realizada com células do sangue periférico de camundongos imunizados 14 dias após a administração da dose vacinal. As células foram tratadas por 5 min no gelo com Ack Lising Buffer (BioSource International) até ruptura das hemácias e então centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. As células foram incubadas a uma concentração de 10^6 células/poço por 6 h a 37 °C 5% CO₂ na presença de Brefeldin A (1 μ g/poço) (GolgiPlug; BD Biosciences) e ausência ou presença do peptídeo específico de E7 (aminoácidos 49-57; RAHYNIVTF; 300 ng/poço) (FELTKAMP et al., 1993). Após este período, as células foram incubadas por 30 min a 4 °C com anticorpo anti-CD8⁺ conjugado com fluorocromo (BD Biosciences). Após permeabilização com Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) por 20 min a 4 °C, as células foram tratadas com anticorpo anti-IFN- γ conjugado com diferente fluorocromo (BD Biosciences) por 30 min a 4 °C. As células foram ressuspensas em PBS e examinadas por citometria de fluxo utilizando o aparelho FACS Canto (BD Biosciences). Os dados foram analisados com o auxílio do programa FlowJo para a determinação das porcentagens de células CD8⁺/INF- γ ⁺ sobre o total de células CD8⁺.

3.14 Avaliação do perfil de citocinas por citometria de fluxo (*Cytometric Bead Array* - CBA)

As dosagens de citocinas no soro e no sobrenadante da cultura de esplenócitos e células dendríticas foram realizadas pelo método CBA. O soro foi coletado nos dias 1, 7 e 14 após a imunização e os sobrenadantes, após 24 h de estímulo. O ensaio de CBA foi realizado com o Kit Th1/Th2/Th17 de acordo com o

manual do fabricante (BD Biosciences) para a quantificação das citocinas IL-2, INF- γ , TNF, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17. Em resumo, a amostra e os padrões de citocinas do kit foram misturados a microesferas de captura recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas e com o anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE) por 2 h a temperatura ambiente e protegidos da luz. Antes da aquisição dos dados, adicionou-se 1 mL da solução de lavagem seguido de centrifugação para retirada do excesso de anticorpos de detecção. A análise por citometria de fluxo baseou-se na leitura da intensidade de fluorescência utilizando o equipamento FACS Calibur (BD Biosciences). Os dados foram analisados com o auxílio do programa FCAP Array 3.0 para a determinação das concentrações (pg/mL) e médias das intensidades de fluorescência (MFI) das amostras e dos padrões.

3.15 Resposta de anticorpos séricos em animais imunizados por meio do ensaio de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Os títulos de anticorpos anti-E7, anti-gD e anti-esporos dos animais imunizados foram medidos em ensaios de ELISA feitos com as proteínas E7 e gD e os esporos vivos e purificados produzidos no laboratório. Os ensaios de ELISA foram realizados com 250 ng/poço das proteínas E7 e gD e 10^6 /poço esporos dispostos em placas MaxiSorp (Nunc). Após incubação de 16 h a 4 °C, as placas foram bloqueadas com 3% gelatina em PBS 1X incubando-as a 37 °C durante 2 h. Em seguida, os soros provenientes dos animais imunizados (individuais ou pool) foram adicionados na diluição inicial 1:25 (ensaio com os esporos) ou 1:10 (ensaio com as proteínas E7 e gD) nas placas, que foram incubadas a 37°C por 1 h. Após a incubação, anticorpos anti-IgG de camundongo conjugados à peroxidase foram diluídos em PBS-Tween 0,05% com 1% gelatina na concentração de 1:3000 e incubados a temperatura ambiente por 1 h nas placas previamente lavadas com PBS-Tween 0,05%. A presença de anticorpos ligados aos antígenos foi visualizada com a solução de revelação (12,5 mL de tampão citrato-fosfato 33 mM, pH 5.0; 5 mg de O-Fenilenodiaminadihidroclorato (OPD); e 5 μ L de H₂O₂ por placa) por 20 min a temperatura ambiente e protegida da luz. A reação foi interrompida com 50 μ L/poço de H₂SO₄ 9 N. As densidades óticas das reações foram determinadas a

492 nm no espectrofotômetro modelo Epoch™ Multi-Volume Spectrophotometer (Bio Tek Instruments).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho foi iniciado com a obtenção e purificação dos esporos de *B. subtilis* da linhagem 1012 e, em seguida, foi dividido em duas vertentes: teste dos esporos como micropartículas carregadoras para biobalística e como adjuvantes vacinais.

4.1 Utilização dos esporos de *B. subtilis* como micropartículas carregadoras para biobalística

4.1.1 Caracterização biofísica dos esporos

Os esporos purificados foram obtidos após cultivo de *B. subtilis* da linhagem 1012, em meio Foerster durante um período de 7 dias. Após centrifugação inicial (10000 rpm/10 min), o precipitado foi lavado (3x) com água destilada para retirada do meio de cultura e rompimento das células vegetativas eventualmente presentes. A quantificação foi realizada através da determinação do número de UFC/mL e confirmada por meio da contagem na câmara de Petroff-Hausser (esporos/mL) para obtenção dos esporos de *B. subtilis* purificados (Figura 3) utilizados neste trabalho.

Figura 3 - Esporos de *B. subtilis* 1012 visualizados por microscopia de contraste de fase

Os esporos foram obtidos a partir do cultivo da bactéria em meio Foerster durante 7 dias, utilizando a estratégia de exaustão de nutriente. Aumento de 1000x.

Para caracterização dos esporos purificados como micropartículas carregadoras, foram analisados parâmetros físicos como tamanho e carga elétrica de superfície. O raio médio das partículas foi determinado através da técnica de *DLS* (*Dynamic Light Scattering*) a partir dos gráficos de distribuição de tamanho obtidos para esporos vivos (Figura 4A) e inativados (por autoclavação) (Figura 4B), resultando em um diâmetro médio de 1,83 μm e 1,65 μm , respectivamente.

Figura 4 - Gráficos de dispersão de luz dinâmica (DLS) para determinação do diâmetro de partículas

Distribuição de tamanho indicando a medida do raio (nm) de esporos vivos (A) e esporos inativados (B) utilizando a água como dispersante.

A carga elétrica total de superfície foi mensurada a partir de valores de potencial-zeta obtidos por meio da técnica de *ELS* (*Electrophoretic Light Scattering*). Esporos vivos e inativados apresentaram carga média negativa de -42 mV e -36 mV respectivamente e, assim como os dados de diâmetro, mostraram-se coerentes com dados anteriormente descritos para esporos de *B. subtilis*: 1,63 μm de comprimento e potencial-zeta igual a -50 mV (HUANG et al., 2010).

4.1.2 Padronização do protocolo de adsorção de DNA à superfície dos esporos

Após caracterização como micropartículas, os esporos foram testados quanto à sua capacidade de adsorção de DNA plasmidial, necessária para sua utilização como carregador vacinal para biobalística. Atualmente, a técnica da biobalística utiliza partículas de ouro de 1 μm de diâmetro impregnadas com DNA plasmidial após adsorção com espermidina 0,05 M e precipitação com CaCl_2 1 M. Para adsorção aos esporos, foram testados diferentes reagentes e concentrações, sob temperaturas e tempos de incubação variáveis, baseados nos protocolos de adsorção de plasmídeo nas partículas de ouro e em partículas de ácido poli(láctico-co-glicólico), PLGA (O'HAGAN et al., 2001), e também da adsorção de proteínas em esporos de *B. subtilis* (HUANG et al., 2010).

A escolha dos reagentes foi baseada na carga elétrica negativa presente na superfície dos esporos e de sequências de DNA. Neste caso foi necessária a utilização de compostos catiônicos capazes de interagir tanto com os esporos quanto com o DNA (espermidina, CaCl_2 , CTAB e DODAB BF) ou soluções que apresentassem cátions livres, como no caso da solução de PBS em pH ácido ou neutro.

Esporos purificados (5×10^8) foram incubados com diferentes reagentes durante 1 h a temperatura ambiente e lavados (1x) com água destilada através de agitação vigorosa. Em seguida adicionou-se uma solução contendo 1 μg de DNA plasmidial (pgDE7h) variando o tempo e a temperatura de incubação (Tabela 1). A quantidade de DNA adsorvida aos esporos foi obtida após centrifugação da suspensão de esporos com DNA e análise eletroforética em gel de agarose da solução sobrenadante contendo ou não DNA remanescente utilizando marcadores padrões de quantificação, como λ Hind III.

Tabela 1 - Resumo das reações de adsorção testadas com esporos purificados de *B. subtilis*

Reagentes	Sem incubação	1 h a 25 °C	6 h a 25 °C	1 h a 4 °C	6 h a 4 °C
Espermidina 0,05 M	-	++	++	-	-
Espermidina 0,1 M	-	-	-	-	-
Espermidina 0,3 M	-	-	-	-	-
PBS pH 4	NT	-	NT	NT	NT
PBS pH 7	NT	-	NT	NT	NT
CaCl ₂ 1 M	NT	-	NT	NT	NT
CTAB 1%	NT	NT	NT	NT	-
CTAB 0,5%	NT	NT	NT	NT	-
CTAB 0,1%	NT	NT	NT	NT	-
CTAB 0,01%	+	+++	+++	+++	+++
DODAB BF 2 mM	+++	+++	+++	NT	NT

(+) adsorção de até 20% da quantidade de DNA adicionada
 (++) adsorção de até 80% da quantidade de DNA adicionada
 (+++) adsorção de 90-100% da quantidade de DNA adicionada
 (NT) não testado

Com base nessa análise, foram selecionados dois reagentes, com os quais se obteve adsorção total (90-100%) do plasmídeo nas melhores condições de reação: tratamento dos esporos com CTAB 0,01% (p/v) ou DODAB BF a 2 mM durante 1 h a temperatura ambiente, com agitação constante e adição do DNA aos esporos tratados mantendo a suspensão à temperatura ambiente e agitação frequente por 1 h.

Uma curva de adsorção do DNA plasmidial aos esporos de *B. subtilis* foi realizada utilizando CTAB 0,01% (Figura 5) e DODAB BF 2 mM (Figura 6), de acordo com o protocolo padronizado descrito acima. Após a realização de cada adsorção a suspensão contendo esporos e DNA foi centrifugada e o sobrenadante analisado em gel de agarose. Nas colunas em que não foi possível visualizar a banda correspondente ao DNA considerou-se que todo o seu conteúdo ficou adsorvido aos esporos, uma vez que não foi detectado DNA remanescente da reação de adsorção (Figura 5A, coluna 7; 5B, coluna 2; 6A, coluna 6; 6B, coluna 2). Como resultado, uma alíquota de 5×10^8 esporos (vivos ou inativados) foi capaz de adsorver cerca de 1 µg de DNA com ambos reagentes.

Figura 5 - Análise do sobrenadante das reações de adsorção de DNA em esporos na presença de CTAB a 0,01%

(A) Adsorção utilizando 1 μ g de DNA (pgDE7h) e variando-se a quantidade de esporos. Em gel de agarose 0,8% foram aplicados volumes iguais para todas as amostras, correspondentes a um quinto da reação de adsorção. Amostras: (1) DNA; (2) DNA + 1×10^7 esporos; (3) DNA + 5×10^7 esporos; (4) DNA + 1×10^8 esporos; (5) DNA + 2×10^8 esporos; (6) DNA + 5×10^8 esporos; (7) DNA + 1×10^9 esporos. (B) Adsorção utilizando 5×10^8 esporos e variando a quantidade de DNA (pgDE7h) adicionada. Em gel de agarose 0,8% foram aplicados volumes iguais para todas as amostras, correspondentes a um vigésimo da reação de adsorção. Amostras: (1) 1 μ g DNA; (2) 1 μ g DNA + esporos; (3) 1,5 μ g DNA; (4) 1,5 μ g DNA + esporos; (5) 2 μ g DNA; (6) 2 μ g DNA + esporos; (7) 2,5 μ g DNA; (8) 2,5 μ g DNA + esporos; (9) 3 μ g DNA; (10) 3 μ g DNA + esporos; (11) 4 μ g DNA; (12) 4 μ g DNA + esporos.

Figura 6 - Análise do sobrenadante das reações de adsorção de DNA em esporos com fragmentos de DODAB BF a 2 mM

(A) Adsorção utilizando 1 μ g de DNA (pgDE7h) e variando-se a quantidade de esporos. Em gel de agarose 0,8% foram aplicados volumes iguais para todas as amostras, correspondentes a um quinto da reação de adsorção. Amostras: (1) DNA; (2) DNA + 1×10^7 esporos; (3) DNA + 5×10^7 esporos; (4) DNA + 1×10^8 esporos; (5) DNA + 2×10^8 esporos; (6) DNA + 5×10^8 esporos. (B) Adsorção utilizando 5×10^8 esporos e variando a quantidade de DNA (pgDE7h) adicionada. Em gel de agarose 0,8% foram aplicados volumes iguais para todas as amostras, correspondentes a um décimo da reação de adsorção. Amostras: (1) 200 ng; (2) 200 ng DNA + esporos; (3) 500 ng DNA; (4) 500 ng DNA + esporos; (5) 1 μ g DNA; (6) 1 μ g DNA + esporos; (7) 2 μ g DNA; (8) 2 μ g DNA + esporos; (9) 3 μ g DNA; (10) 3 μ g DNA + esporos; (11) 4 μ g DNA; (12) 4 μ g DNA + esporos; (13) 5 μ g DNA; (14) 5 μ g DNA + esporos.

Esporos purificados de *B. subtilis* também foram capazes de adsorver, além de plasmídeos, oligonucleotídeos como o CpG (de 20bp), na mesma proporção obtida para DNA plasmidial, isto é, 5×10^8 esporos (vivos ou inativados) para 1 μg de CpG (Figura 7). A metodologia de adsorção e de análise eletroforética utilizadas foram as mesmas descritas anteriormente e foram utilizados tanto CTAB 0,01% como DODAB BF 2 mM.

Figura 7 - Adsorção de CpG em esporos de *B. subtilis* na presença de DODAB BF a 2 mM

Adsorção utilizando 5×10^8 esporos vivos e variando a quantidade de CpG. Em gel de agarose 0,8% foram aplicados volumes iguais para todas as amostras, correspondentes a um quinto da reação de adsorção. Amostras: (1) Esporos + 1 μg CpG; (2) Esporos + 2 μg CpG; (3) Esporos + 3 μg CpG; (4) Esporos + 4 μg CpG; (5) Esporos + 5 μg CpG; (6) Esporos + 6 μg CpG.

A fim de complementar as evidências já existentes quanto à capacidade de adsorção de DNA aos esporos, 5×10^8 esporos foram impregnados com 1 μg de DNA e incubados com solução diluída de DAPI e, em seguida, visualizados ao microscópio de fluorescência. A presença de DNA adsorvido resultou em fluorescência da suspensão de esporos, a qual não foi detectada para a suspensão de esporos sem o DNA impregnado (Figura 8).

Figura 8 - Marcação de DNA plasmidial adsorvido na superfície dos esporos

Esporos de *B. subtilis* foram impregnados ou não com 1 μg de pgDE7h e incubados com solução diluída de DAPI para marcação do DNA. Imagens do campo claro (A) e com fluorescência (C) dos esporos com DNA adsorvido em sua superfície. B e D correspondem às imagens obtidas em campo claro e com fluorescência, respectivamente, de esporos não impregnados com DNA e utilizados como controle neste experimento. Magnitude: 1000 x.

4.1.3 Padronização do procedimento de preparo dos cartuchos utilizados na biobalística

Após padronização da adsorção de DNA, a próxima etapa foi elaborar um protocolo de preparo dos cartuchos de esporos recobertos com DNA plasmidial. Para isso, testou-se o procedimento comumente empregado na biobalística para as partículas de ouro, onde se utiliza PVP 0,05 mg/mL para impregnação das mesmas no tubo de Tefzel® e posterior obtenção dos cartuchos após 10 min à temperatura ambiente. Para os esporos de *B. subtilis*, padronizou-se a mesma solução de PVP, porém deixando o tubo fechado por cerca de 16 h – tempo necessário para a sedimentação e impregnação dos esporos no tubo. Após este período, o sobrenadante contendo PVP foi recolhido e quantificado na câmara de Petroff-Hausser através do número de esporos/mL. Para 5×10^8 esporos (1 μg de DNA adsorvido) por cartucho, houve uma perda de aproximadamente 0,4% da quantidade inicial de esporos adicionada ao tubo.

Os cartuchos também foram quantificados quanto ao número de esporos impregnados, após armazenamento em diferentes temperaturas. Os esporos foram

recuperados manualmente do cartucho após agitação vigorosa com tampão TE. Para 5×10^8 esporos adicionados por cartucho, a média do número de esporos recuperada foi de $1,6 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$ e $2,7 \times 10^8$ para as temperaturas de 4 °C, -20 °C e -80 °C testadas. Portanto, padronizou-se para os cartuchos de esporos uma temperatura de armazenamento de -80 °C, até sua utilização.

A Figura 9 mostra cartuchos preparados com ouro e esporos, impregnados com DNA plasmidial, segundo metodologia anteriormente descrita. Após armazenamento a -80 °C por 7 dias, os cartuchos foram utilizados no *gene gun* para ilustrar a possibilidade de propulsão dos esporos sob alta pressão de gás hélio. Para o cartucho impregnado com micropartículas de ouro, nota-se que há conteúdo remanescente após o tiro com *gene gun* (Figura 9C) e, para o cartucho contendo esporos, praticamente todo o conteúdo foi propulsado após o tiro (Figura 9D).

Figura 9 - Cartuchos utilizados nas transfecções por biobalística

Os cartuchos foram preparados de acordo com protocolo padronizado para as partículas de ouro (A) e esporos (B). (C) e (D) mostram os cartuchos de ouro e esporos, respectivamente, após propulsão com *gene gun* a uma pressão de gás hélio igual a 500 psi.

4.1.4 CTAB versus DODAB BF: Análise do perfil de adsorção de DNA plasmidial à superfície dos esporos

CTAB e DODAB são tensoativos catiônicos que possuem uma parte hidrofílica e uma cauda hidrofóbica e que, ao se ionizarem em solução aquosa, fornecem íons orgânicos carregados positivamente. O CTAB, dependendo da concentração, pode formar micelas. Já o DODAB forma vesículas que podem passar pelo processo de sonicação resultando em fragmentos de bicamada também carregados positivamente. No presente trabalho, a concentração de CTAB utilizada para a adsorção completa (0,01% p/v) é menor do que a concentração micelar crítica (CMC) e não foram utilizadas vesículas de DODAB, apenas os fragmentos.

Além dessas, os dois tensoativos apresentaram outras diferenças no que diz respeito à interação com o DNA. Após padronização do protocolo de adsorção de DNA aos esporos com CTAB e DODAB BF, realizou-se a análise do perfil de adsorção através de duas estratégias. A primeira delas foi a determinação do potencial-zeta resultante das etapas de adsorção: tratamento dos esporos com o reagente e adsorção propriamente dita do DNA plasmidial aos esporos tratados (Figura 10).

Figura 10 - Análise do potencial zeta de esporos de *B. subtilis* 1012 vivos (EV) ou inativados (EI) em diferentes etapas da reação de adsorção

Etapas de adsorção: (E) em água; (E+Reagente) após incubação com CTAB 0,01% ou fragmentos de DODAB BF 2 mM e (E+Reagente+DNA) após adsorção de 1 µg de DNA (pgDE7h), de acordo com o protocolo de adsorção padronizado neste trabalho.

A determinação da carga elétrica das partículas ao final de cada etapa sugere que tipo de interação esporo-reagente-DNA ocorreu. Esporos (vivos ou inativados) não mostraram alteração significativa do potencial-zeta após tratamento com CTAB e nem com DNA adsorvido em sua superfície, permanecendo com uma carga elétrica líquida negativa em ambas as situações. Já os esporos tratados com os fragmentos de DODAB apresentaram uma inversão total de cargas em relação ao potencial-zeta nativo e uma diminuição substancial da carga de superfície após adsorção com o DNA plasmidial, ficando próxima a neutralidade (com esporos inativados) ou negativa como inicialmente (com esporos vivos).

Diante do fato de que os esporos adsorvem a mesma quantidade de DNA com ambos reagentes e analisando os resultados de potencial-zeta anteriormente demonstrados, é possível dizer que há perfis diferentes de interação entre esporos, DNA e os dois reagentes. De acordo com o protocolo de adsorção padronizado neste trabalho, pode-se sugerir que a interação dos esporos com o DODAB BF é baseada na distribuição de cargas entre a superfície particulada e o reagente, assim como a interação entre o reagente e o DNA. Entretanto, nas ligações esporos-CTAB e CTAB-DNA provavelmente há predominância de interações mais fortes que não se baseiam meramente em cargas, mas também em ligações hidrofóbicas – comprovadamente existentes nas interações entre esporos e proteínas heterólogas adsorvidas (HUANG et al., 2010).

Para confirmar tal hipótese, utilizamos uma segunda estratégia de avaliação dos perfis de adsorção: a quantificação e análise em gel de agarose do DNA plasmidial presente nos cartuchos preparados para biobalística (Figura 11).

Figura 11 - Avaliação do perfil do DNA plasmidial recuperado nos cartuchos de biobalística

Análise por eletroforese em gel de agarose 0,8% dos sobrenadantes obtidos após procedimento realizado com tampão TE e agitação vigorosa dos cartuchos contendo 1 µg de plasmídeo adsorvido aos esporos com CTAB 0,01% ou fragmentos de DODAB BF 2 mM. Foram aplicados volumes iguais para todas as amostras, correspondentes a um quinto da reação de adsorção. O cartucho preparado com ouro foi considerado um controle desse procedimento. (1) DNA; (2) DNA+CTAB+esporos vivos; (3) DNA+CTAB+esporos inativados; (4) DNA+DODAB+esporos vivos; (5) DNA+DODAB+esporos inativados; (6) DNA+Ouro.

Visualmente, é possível notar que a quantidade de DNA recuperada em todas as amostras (Figura 11, colunas 2 a 6) foi menor do que a esperada (Figura 11, coluna 1). Porém, vale ressaltar que, diferentemente do ouro, cartuchos preparados com esporos mostraram um perfil diferente de DNA plasmidial recuperado, apresentando inclusive certo grau de fragmentação. Não foi possível visualizar o DNA adsorvido com CTAB, podendo-se concluir que, por esta metodologia, o DNA adsorvido não foi liberado dos esporos vivos nem dos inativados e, portanto sugerindo uma interação mais forte entre eles. Já o DNA adsorvido com DODAB BF mostrou-se uma alternativa mais promissora em relação à sua recuperação frente à mesma metodologia. Entretanto, com esporos vivos o DNA mostrou-se de forma diferente da esperada, apresentando uma banda mais forte e posicionada mais acima no gel de agarose, correspondente a formas mais instáveis do plasmídeo (linear ou “cortado”). Com os esporos inativados, o perfil visualizado foi ainda mais promissor, bem semelhante ao obtido com o cartucho preparado com ouro, mostrando-se como uma boa e possível estratégia para substituição das partículas de ouro na biobalística.

4.1.5 Transfecções *in vitro* e *in vivo* com o gene repórter codificando luciferase (*luc2*) em cartuchos preparados com esporos

Para comprovar a utilização dos esporos na biobalística foram realizadas transfecções *in vitro* e *in vivo* com objetivo de detectar a atividade do gene repórter *luc2* após administração com *gene gun*. O plasmídeo pLuc, que codifica o gene em questão, foi adsorvido à superfície de esporos de *B. subtilis* vivos e inativados utilizando tanto CTAB a 0,01% (Figuras 12A e 13A) e com o DODAB BF a 2 mM (Figuras 12B e 13B). Como controle positivo de transfecção foram utilizadas partículas de ouro de 1 µm impregnadas com o mesmo plasmídeo, segundo protocolo padrão existente.

Figura 12 - Imagens de bioluminescência de células eucarióticas COS7 transfectadas com pLuc por biobalística

Os cartuchos para transfecção foram preparados com 1 µg de pLuc adsorvido em partículas de ouro e nos esporos, em quantidades padronizadas, utilizando (A) CTAB 0,01% e (B) DODAB BF 2 mM. O controle negativo corresponde a células COS7 não transfectadas. Os resultados de luminescência foram obtidos 48 h após a transfecção.

Também foram realizadas transfecções *in vivo*, em camundongos C57BL/6, com os mesmos cartuchos preparados para os testes *in vitro* contendo 1 µg pLuc e também com outros preparados pela mesma metodologia porém contendo 2 µg pLuc. Todos os animais foram administrados pela via intradérmica com dois cartuchos cada, totalizando doses de 2 µg e 4 µg pLuc por animal.

Figura 13 - Imagens de bioluminescência de camundongos da linhagem C57BL/6 administrados pela via intradérmica com pLuc por biobalística

Os cartuchos para transfecção foram preparados com 1 ou 2 µg de pLuc adsorvidos em partículas de ouro e nos esporos, em quantidades padronizadas, utilizando (A) CTAB 0,01% e (B) DODAB BF 2 mM. Foram administrados dois cartuchos por animal, na região abdominal, a uma pressão de gás hélio igual a 500 psi. O controle negativo corresponde aos animais não-transfectados. Os resultados de luminescência foram obtidos 48 h após a transfecção.

Os dados de transfecção *in vitro* e *in vivo* com o plasmídeo pLuc apresentados acima foram coerentes à hipótese colocada anteriormente sobre os diferentes perfis de interação entre esporos, DNA e os dois reagentes utilizados na

adsorção (CTAB e DODAB BF). Esporos impregnados com pLuc com CTAB não se mostraram eficientes nas transfecções plasmidiais com *gene gun*. Esporos vivos impregnados com pLuc com DODAB BF, apresentaram resultados inferiores de luminescência nas transfecções *in vivo* em relação aos esporos inativados e ao ouro, e não se mostram eficientes na transfecção *in vitro*. Já as transfecções com pLuc adsorvido aos esporos inativados com DODAB BF apresentaram resultados satisfatórios, semelhantes aos obtidos com as partículas de ouro, consolidando dessa maneira a possibilidade de sua utilização na biobalística.

4.1.6 Imunização de camundongos C57BL/6 com *gene gun*

Como prova de conceito da utilização de esporos inativados de *B. subtilis* como micropartículas para biobalística utilizando DODAB BF para impregnação plasmidial, grupos de cinco animais foram imunizados com a vacina de DNA pgDE7h, em regime profilático (Figura 14). Paralelamente, realizou-se a imunização com micropartículas de ouro (protocolo padrão de preparo dos cartuchos) para fins de comparação.

Figura 14 - Desenho esquemático do regime vacinal profilático realizado por biobalística

Os animais imunizados receberam duas doses contendo 4 µg pgDE7h/2x10⁹ esporos ou 2 µg pgDE7h/ouro por dose e desafiados uma semana depois da 2ª imunização. Nos dias 7, 14 e 28 foram feitas coletas de sangue para avaliação da resposta humoral e celular através dos ensaios de ELISA e ICS, respectivamente. Após 40 dias do desafio tumoral, todos os animais foram sacrificados.

Apesar de não haver diferença estatística na média entre os grupos “Controle” e “Esporos” (Figura 15A), a avaliação da resposta celular realizada individualmente mostra que alguns animais imunizados com esporos por biobalística apresentaram uma quantidade significativa de células T CD8⁺ E7-específicas produtoras de IFN-γ em relação ao grupo controle (Figura 15B). De fato, diferentemente do grupo não

imunizado (controle) que não apresentou qualquer tipo de regressão tumoral, 20% dos camundongos imunizados com esporos tiveram seu volume tumoral controlado (aproximadamente 5mm^3) até o final do experimento. Em relação à resposta de anticorpos, esse grupo também apresentou resultados promissores, com títulos de IgG E7-específicos significativos após a 1ª dose (Figura 16) próximos ao grupo imunizado com ouro, o qual apresentou 100% de proteção antitumoral (dados não mostrados). Vale ressaltar que neste caso, ao contrário do resultado obtido com ouro, a imunização com esporos gerou uma diminuição no título de anticorpos IgG após 14 dias. Estudos mostram que, após uma dose inicial de esporos de *B. subtilis*, anticorpos IgG anti-esporos são produzidos e, por meio de mecanismos distintos, podem neutralizar a soroconversão em alguns casos, aumentando por exemplo a captação e destruição por meio do processo de opsonização (YU; CUTTING, 2009).

Figura 15 - Indução de células T CD8^+ produtoras de $\text{IFN-}\gamma$ E7 específicas em camundongos C57BL/6 imunizados por biobalística

A detecção das células T CD8^+ E7 específicas foi realizada com PBMCs individuais incubados com o peptídeo E7-MHC classe I ($^{49}\text{RAHYNIVTF}^{57}$) e marcadas com os anticorpos anti- CD8 (FITC) e anti- $\text{IFN-}\gamma$ intracelular (PE). A, representação das porcentagens de células T $\text{CD8}^+\text{IFN-}\gamma^+$ sobre o total de células T CD8^+ obtidas para cada animal e a média por grupo. B, gráfico representativo de um animal por grupo com as porcentagens de células T $\text{CD8}^+\text{IFN-}\gamma^+$ sobre o total de células T CD8^+ indicadas no quadrante superior direito dos gráficos. Significância estatística: (**) $p < 0,01$ (ANOVA).

Figura 16 - Determinação dos títulos de IgG total E7-específicos após imunização por biobalística

O soro dos animais foi coletado uma semana após a 1ª e a 2ª dose (dias 7 e 14) e o título obtido após ensaio de ELISA. Os animais do grupo controle receberam o desafio tumoral com as células TC-1, porém não foram imunizados. Os dados mostrados representam a média do resultado obtido com grupos de cinco animais analisados de forma individual e em duplicata. Significância estatística: (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,005$, (****) $p < 0,0001$, versus grupo *Controle* (ANOVA).

Portanto, além de confirmar suas propriedades como micropartículas carregadoras (tamanho e carga), o presente trabalho mostrou que é possível adsorver na superfície dos esporos de *B. subtilis* substâncias nunca antes testadas/publicadas no meio científico: plasmídeos e oligonucleotídeos. O trabalho ainda descreve uma nova metodologia de adsorção que utiliza diferentes reagentes dos comumente empregados para tal, como cloreto de cálcio, espermidina e soluções tamponadas de PBS. Por fim, o trabalho comprovou a utilização de esporos de *B. subtilis* como substitutos da micropartículas de ouro para biobalística, refletindo em uma redução de custo em cerca de 5.000x: para 1.000 doses o custo usando ouro é de R\$ 1.600,00 enquanto para esporos o custo é de apenas R\$ 0,30. Como conclusão geral desta primeira parte do trabalho tem-se que esporos de *B. subtilis* podem ser utilizados como micropartículas para imunização por biobalística, sendo capazes de gerar resposta imune humoral e celular específica e fornecer certo retardo no crescimento tumoral quando associados a uma vacina de DNA contra o HPV-16.

4.2 Esporos de *B. subtilis* como adjuvantes vacinais

Esporos de *B. subtilis* têm sido apontados como moduladores de resposta imune do hospedeiro (CIABATTINI et al., 2004), possuindo importantes propriedades adjuvantes. Paccez e colaboradores (2006) sugerem que a administração parenteral de esporos de *B. subtilis* ativam preferencialmente, uma resposta do tipo Th1 e, conseqüentemente, uma resposta imune mais eficiente de células T, importante para a obtenção de uma resposta citotóxica e protetora no caso de vacinas terapêuticas. Barnes e colaboradores (2007) mostraram que a inoculação por via parenteral de esporos aumentou tanto a resposta imune humoral como a resposta imune celular antígeno-específicas, sugerindo sua utilização como micropartículas “naturais” com propriedades adjuvantes e a aplicação futura dos mesmos na clínica por meio de sua coadministração a vacinas.

Neste trabalho foram realizados ensaios com esporos purificados de *B. subtilis* 1012 a fim de se investigar alguns de seus efeitos imuno-moduladores e seu papel adjuvante quando coadministrados a vacina terapêutica baseada no plasmídeo pgDE7h.

4.2.1 Determinação do perfil de células recrutadas no local de inoculação de esporos de *B. subtilis*

Primeiramente, esporos vivos e inativados foram avaliados em relação ao influxo de células gerado após serem inoculados por via intraperitoneal em camundongos C57BL/6. Paralelamente, inoculou-se a LTIIa (toxina LT de *E. coli*) pela mesma via como forma de comparar os resultados obtidos com os esporos, uma vez que é considerada um adjuvante da mesma classe dos esporos. A adjuvantividade e as propriedades inflamatórias geradas pela inoculação parenteral de LTIIa foram demonstradas por Mathias-Santos e colaboradores (2011). De acordo com os resultados demonstrados na Figura 17, esporos (vivos e inativados) apresentaram um perfil inflamatório significativamente superior ao obtido após inoculação da toxina, com aumento do recrutamento de células F4/80⁺, CD11b⁺Gr1⁺ e F4/80⁺Ly6C^{hi}, frequentemente associadas a macrófagos, e células mielóides-supressoras (MDSCs) e monócitos inflamatórios nesta ordem (PARK et al., 2013; NONAKA et al., 2008). Já LTIIa apresentou maior frequência de células CD19⁺ em

relação aos esporos, sugerindo uma maior concentração local de linfócitos B e, por sua vez, maior relação com uma resposta de anticorpos. Nas condições em que foram realizados os ensaios, células CD11c⁺ (associadas a células dendríticas) não demonstraram diferença significativa entre os grupos de toxina e esporos e nem com o grupo PBS.

Figura 17 - Influxo celular após inoculação de esporos de *B. subtilis* por via intraperitoneal

As células foram obtidas após lavagem intraperitoneal de camundongos C57BL/6 24 h após a inoculação de PBS, LTIIa (500ng), esporos vivos (5×10^8) ou esporos inativados (5×10^8). As células foram marcadas com diferentes anticorpos e fluorocromos e analisadas por citometria de fluxo. O gráfico representa um de dois experimentos independentes e mostra a média da porcentagem de células obtidas de dois animais por grupo. Significância estatística: (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,005$; (****) $p < 0,0001$, versus grupo PBS (ANOVA).

Trabalhos publicados anteriormente mostram que macrófagos desempenham papel fundamental contra infecções causadas por esporos de *Bacillus anthracis*. Cote e colaboradores (2006) observaram que camundongos tratados com lipossomos de clodronato (que causa depleção de macrófagos - células F480⁺ e CD11b⁺) apresentaram maior carga bacteriana e em um tempo menor que animais não tratados (solução salina) após desafio intraperitoneal com esporos inativados. Resultados obtidos no presente trabalho corroboram com tal evidência mostrando a importância deste tipo celular frente ao desafio com esporos de *B. subtilis*, onde macrófagos se destacaram dentre outras células recrutadas na cavidade intraperitoneal.

4.2.2 Ativação *in vitro* e perfil de citocinas produzidas por células dendríticas estimuladas com esporos de *B. subtilis*

Como forma de comprovar o papel adjuvante dos esporos em relação à apresentação de antígenos, células dendríticas diferenciadas *in vitro* foram estimuladas com esporos vivos ou inativados e investigadas quanto à sua ativação por meio de alguns marcadores considerados receptores co-estimulatórios de resposta imune. Tal capacidade de ativação já foi mencionada anteriormente (BARNES et al., 2007) mas nunca associada a plasmídeos vacinais. As figuras que se seguem mostram a magnitude de ativação das células frente aos receptores CD40⁺, CD80⁺, CD86⁺ na forma de histogramas (Figuras 18A e 18B) e com base na intensidade média de fluorescência (Figura 18C), na presença do plasmídeo vacinal pgDE7h e dos esporos (vivos ou inativados).

Figura 18 - Análise da população de células dendríticas utilizadas no ensaio de ativação após exposição aos esporos de *B. subtilis*

(A) As células obtidas após diferenciação *in vitro* foram marcadas com o anticorpo anti-CD11c (PE) e analisadas através de citometria de fluxo para obtenção da porcentagem de células CD11c⁺. As células foram estimuladas por 24 h com DNA (pgDE7h), 5×10^8 esporos vivos ou 5×10^8 esporos inativados e marcadas com anticorpos anti-CD40, anti-CD80 e anti-CD86 (APC). O estímulo com PBS foi considerado um controle negativo do experimento. (B) Os gráficos representam o resultado de um experimento de três independentes. (C) Intensidade média de fluorescência dos três experimentos realizados independentemente. Significância estatística: (**) $p < 0,01$, versus grupo PBS (ANOVA).

Ao contrário do plasmídeo vacinal testado, esporos de *B. subtilis* foram capazes de gerar uma ativação *in vitro* de células dendríticas, constatada em maiores proporções quando estimuladas com esporos vivos em relação à ativação gerada pelos esporos inativados. O plasmídeo não foi capaz de gerar ativação das células, obtendo uma curva de mesma magnitude que a originada por células estimuladas com PBS. A mesma intensidade de ativação foi observada quando as mesmas células foram estimuladas com esporos (vivos ou inativados) coadministrados ao DNA (dados não mostrados), evidenciando dessa maneira o papel predominante dos esporos neste tipo de ensaio de imuno-modulação. Além do ensaio de ativação de células dendríticas, esporos vivos e inativados mostraram diferença na análise de citocinas do sobrenadante da cultura das células estimuladas (Figura 19).

Figura 19 - Secreção de citocinas pelas células dendríticas estimuladas *in vitro* após exposição aos esporos de *B. subtilis*

A dosagem das citocinas do sobrenadante da cultura de células foi realizada através da determinação da intensidade média de fluorescência obtida pelo ensaio de CBA e citometria de fluxo. As células foram estimuladas durante 24 h com 1 µg do plasmídeo vacinal pgDE7h (DNA), 5×10^8 esporos vivos (EV) ou 5×10^8 esporos inativados (EI). A adição de PBS apirogênico foi considerada um controle deste experimento.

Na presença de esporos inativados, as células dendríticas secretaram uma quantidade maior das citocinas IL-6 e TNF do que quando estimuladas apenas com DNA. Em contrapartida, as mesmas citocinas apresentaram concentrações não-mensuráveis na presença de esporos vivos. Resultados semelhantes realizados com esporos inativados de *B. subtilis* foram obtidos por Cerovic e colaboradores (2009), que demonstraram que a injeção intra-intestinal destes esporos induziu a migração de células dendríticas ativadas (mediante expressão de CD80 e CD86). Além disso,

células dendríticas provenientes do intestino (CD103⁺MHC class II^{high}) estimuladas *in vitro* com os esporos inativados secretaram quantidades significativas de IL-6 quando comparadas ao LPS.

TNF (fator de necrose tumoral) é uma citocina envolvida na inflamação sistêmica e na regulação das células do sistema imune induzindo morte celular por apoptose e inibindo a tumorigênese. IL-6 pode agir como uma citocina pró ou anti-inflamatória, mas sua secreção está frequentemente associada a infecções, traumas e lesões teciduais. Tanto IL-6 como TNF podem ser consideradas citocinas pró-inflamatórias que, muitas vezes, estão associadas a diferentes tipos de câncer presentes em níveis elevados no microambiente tumoral (MANNELLO; LIGI; CANALE, 2013) e estão frequentemente associadas à toxicidade transiente em ensaios de vacinação, especialmente durante as primeiras 24 h após a inoculação do agente patogênico ou antigênico (LI et al., 2013).

Neste cenário, pode-se sugerir que esporos vivos devem ser capazes de exercer um papel essencial na geração de resposta imune, com potencial adjuvante, e induzindo um menor grau de inflamação, muitas vezes prejudiciais à resposta citotóxica contra tumores.

4.2.3 Efeito adjuvante de esporos de *B. subtilis* coadministrados ao plasmídeo vacinal por via parenteral

De acordo com os resultados anteriores, esporos demonstraram ser capazes de recrutar células importantes relacionadas a geração de inflamação local de forma superior a LTIIa, e ainda, ativar células essenciais na apresentação de antígeno, como as células dendríticas, podendo exercer papel importante como adjuvantes vacinais. De fato, a coadministração dos esporos de *B. subtilis* a vacina de DNA pgDE7h em regime terapêutico (Figura 20) resultou em um aumento significativo da produção de células T CD8⁺IFN- γ ⁺ E7-específicas em camundongos previamente inoculados com células tumorais TC-1 em relação aos animais imunizados apenas com o plasmídeo (Figura 21). Vale ressaltar que a diferença de resposta entre esporos vivos e inativados também foi evidenciada neste ensaio, onde, de forma geral, esporos vivos apresentaram maior indução dessas células em relação aos inativados.

Figura 20 - Desenho esquemático do regime vacinal terapêutico realizado com esporos coadministrados a pgDE7h pela via intramuscular

Os animais foram imunizados com 40 μg pgDE7h misturados ou não a 2×10^7 esporos vivos ou inativados três dias após o desafio com as células tumorais TC-1. Foram feitas coletas de sangue 7 e 14 dias após a imunização para avaliação da resposta humoral e celular através dos ensaios de ELISA e ICS, respectivamente. Após 60 dias do desafio tumoral, todos os animais foram sacrificados.

Figura 21 - Indução de células T CD8^+ produtoras de $\text{IFN-}\gamma$ E7 específicas em camundongos C57BL/6 imunizados pela via intramuscular com os esporos de *B. subtilis*

Os animais foram imunizados com 40 μg pgDE7h misturados ou não a 2×10^7 esporos (vivos, EV ou inativados, EI) três dias após o desafio com as células TC-1. A detecção das células T CD8^+ E7 específicas foi realizada com o pool de PBMCs incubados com o peptídeo E7-MHC classe I ($^{49}\text{RAHYNIVTF}^{57}$) e marcadas com os anticorpos anti- CD8 (FITC) e anti- $\text{IFN-}\gamma$ intracelular (PE). No quadrante superior direito dos gráficos estão indicadas as porcentagens de células T CD8^+ $\text{IFN-}\gamma^+$ sobre o total de células T CD8^+ obtidas para cada grupo de imunização (5 animais por grupo).

A coadministração dos esporos ao plasmídeo vacinal pgDE7h também se mostrou eficiente em ensaio terapêutico de imunização, resultando no aumento significativo da proteção contra tumores induzidos em camundongos C57BL/6 previamente inoculados com células tumorais TC-1 (Figura 22). Os dados de resposta celular específica e proteção terapêutica obtidos (Figuras 21 e 22) foram coerentes aos anteriormente obtidos por DINIZ e colaboradores (2013) em relação à vacinação do plasmídeo sozinho (não co-administrado).

Figura 22 - Ensaio de proteção terapêutica em camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 e inoculados pela via intramuscular com esporos de *B. subtilis*

Os animais foram imunizados com uma dose de 40 µg de pgDE7h ou misturado a 2×10^7 esporos (vivos ou inativados); aqueles que receberam somente PBS foram considerados o grupo controle. O desafio foi feito através da inoculação por via subcutânea de $7,5 \times 10^4$ células TC-1 por animal.

Neste caso, apesar das diferenças apontadas entre esporos vivos e inativados nos ensaios anteriormente mostrados de ativação de células dendríticas, produção de citocinas e células T específicas, a proteção terapêutica contra tumores associados ao HPV-16 mostrou-se igualmente promissora, consolidando dessa maneira, a utilização de esporos de *B. subtilis* como micropartículas adjuvantes quando associadas a vacina de DNA, aumentando em duas vezes a porcentagem de animais livres de tumor.

4.2.4 Relação dose-efeito de esporos de *B. subtilis*

Estudos recentes mostram que o efeito adjuvante de esporos de *B. subtilis* ocorre de forma dose-dependente. Barnes e colaboradores (2007) utilizaram como modelo antigênico o fragmento C do toxóide tetânico (TT) e demonstraram que a intensidade da resposta imune celular e humoral aumentava proporcionalmente à concentração de esporos coadministrados ao antígeno. Por via intranasal, os títulos de IgA específicos aumentaram juntamente com a quantidade de esporos, assim como os títulos de IgG e proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺ específicos após imunização por via subcutânea na proporção $5 \times 10^8 > 5 \times 10^7 > 5 \times 10^6$ esporos.

O presente trabalho, porém, mostra que quando esporos de *B. subtilis* são coadministrados a uma vacina de DNA, há uma concentração ideal para a observação do efeito de adjuvantividade em relação à resposta celular específica e, consequentemente, à proteção antitumoral *in vivo*.

Em ensaio terapêutico utilizando o modelo TC-1, a coadministração do plasmídeo pgDE7h a diferentes quantidades de esporos pela via intramuscular resultou em diferentes porcentagens de células T CD8⁺IFN- γ ⁺/T CD8⁺ E7-específicas (Figura 23). O grupo que recebeu a coadministração de 2×10^7 esporos teve maiores porcentagens de células T CD8⁺IFN- γ ⁺ do que o grupo imunizado com 2×10^6 esporos (diferença estatística) enquanto que o grupo imunizado com 2×10^8 esporos apresentou resultados semelhantes ao grupo controle (sem diferença estatística) (Figura 23A).

Figura 23 - Indução de células T $CD8^+IFN-\gamma^+$ E7-específicas em camundongos C57BL/6 imunizados pela via intramuscular com diferentes concentrações de esporos coadministrados a vacina de DNA

A

B

Os animais foram imunizados com 40 μ g pgDE7h misturados ou não a 2×10^6 , 2×10^7 ou 2×10^8 esporos vivos (EV) três dias após o desafio com as células TC-1. A detecção das células T $CD8^+$ E7-específicas foi realizada individualmente com PBMCs incubados com o peptídeo E7-MHC classe I (49 RAHYNIVTF 57) e marcadas com os anticorpos anti-CD8 (FITC) e anti-IFN- γ intracelular (PE). A, representação das porcentagens de células T $CD8^+IFN-\gamma^+$ sobre o total de células T $CD8^+$ obtidas para cada animal e a média por grupo. B, gráfico representativo de um animal por grupo com as porcentagens de células T $CD8^+IFN-\gamma^+$ sobre o total de células T $CD8^+$ indicadas no quadrante superior direito dos gráficos. Significância estatística: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$, versus grupo PBS (ANOVA).

O mesmo fenômeno ocorreu em relação à proteção anti-tumoral terapêutica utilizando as mesmas concentrações de esporos a vacina de DNA pgDE7h (Figura 24). O grupo que recebeu 2×10^7 esporos juntamente com o DNA obteve maior porcentagem de proteção antitumoral (80%). Em contrapartida, o grupo que coadministrou 2×10^6 esporos não teve aumento na proteção em relação ao grupo

imunizado com apenas o DNA, com proteção igual a 40%. Já no grupo imunizado com a maior concentração de esporos, 2×10^8 , todos os animais desenvolveram tumores e tiveram um perfil de crescimento tumoral semelhante ao grupo controle (PBS).

Figura 24 - Ensaio de proteção terapêutica em camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 e inoculados pela via intramuscular com diferentes quantidades de esporos coadministrados a vacina de DNA

Os animais foram imunizados com uma dose de 40 μ g de pgDE7h ou misturado a 2×10^6 , 2×10^7 ou 2×10^8 esporos vivos; aqueles que receberam somente PBS foram considerados o grupo controle. O desafio foi feito através da inoculação por via subcutânea de $7,5 \times 10^4$ células TC-1 por animal. Este gráfico representa o resultado obtido de três experimentos independentes.

Vale ressaltar, que o efeito adjuvante obtido com a coadministração de 2×10^7 esporos aumentou em duas vezes a proteção terapêutica antitumoral em relação aos camundongos imunizado com apenas a vacina de DNA, independente da quantidade inoculada da mesma, como observado em ensaio de proteção antitumoral utilizando apenas 25 μ g do plasmídeo, em que se obteve 40% de animais livres de tumor quando imunizados com DNA+ 2×10^7 EV *versus* 20% obtidos para o grupo vacinado com apenas DNA e DNA+ 2×10^6 EV, e nenhuma proteção para os grupos PBS e DNA+ 2×10^8 EV (dados não mostrados).

Na tentativa de se investigar tal fenômeno, esplenócitos de camundongos *naïve* foram estimulados *in vitro* com as mesmas concentrações de esporos utilizadas nas imunizações mostradas acima e avaliados em relação à produção de citocinas (Figura 25). Estudos recentes mostram que esplenócitos de animais imunizados (por via intranasal) com 10^9 esporos inativados de *B. subtilis* como

adjuvantes vacinais, produziram citocinas importantes para a resposta imune, tais como IL-2, IL-6 e IFN- γ após estímulo *in vitro* com um mesmo antígeno viral, sugerindo assim que os esporos são capazes de induzir tanto uma resposta do tipo Th1 como Th2 (SONG et al., 2012).

Figura 25 - Secreção de citocinas por esplenócitos de camundongos *naïve* estimulados *in vitro*

A dosagem das citocinas do sobrenadante da cultura de células foi realizada através da determinação da intensidade média de fluorescência obtida pelo ensaio de CBA e citometria de fluxo. As células foram estimuladas durante 24 h com 1 μ g do plasmídeo vacinal pgDE7h (DNA), 2×10^6 , 2×10^7 ou 2×10^8 esporos vivos (EV). A adição de PBS apirógeno foi considerada um controle deste experimento. Os gráficos representam a média de dois experimentos independentes. Significância estatística: (*) $p < 0,05$; (****) $p < 0,0001$, versus grupo PBS (ANOVA).

No presente trabalho, as células estimuladas com 2×10^7 esporos apresentaram maior concentração de citocinas importantes para a resposta citotóxica, como IFN- γ e TNF em relação aos outros grupos (sem diferença estatística). Além disso, o grupo 2×10^6 EV apresentou quantidades significativamente maiores de IL-10, uma citocina característica de imunossupressão. A expressão da citocina IL-10 é em geral desencadeada pela presença de patógenos comensais e sua produção ocorre, frequentemente, por linfócitos Th2 e células T regulatórias (Treg) – estas, intimamente relacionadas à supressão da resposta imune. A citocina IFN- γ , por sua vez, mostra-se essencial no desencadeamento de uma resposta citotóxica, e, portanto, no mecanismo antitumoral. Apesar de suas propriedades conhecidamente envolvidas em inflamações crônicas, TNF tem sido apontada como uma citocina multifuncional capaz de induzir diferentes tipos de resposta, inclusive Th1 através da diferenciação de monócitos em células dendríticas (IWAMOTO et al.,

2007). Os resultados mostrados anteriormente demonstram possíveis mecanismos envolvidos na supressão da resposta de linfócitos T citotóxicos induzida pelo grupo 2×10^6 EV, e no aumento da mesma induzida pela coadministração de 2×10^7 esporos.

Corroborando com tais resultados, animais que foram inoculados com 2×10^8 esporos pela via intraperitoneal, apresentaram maior influxo celular local de células envolvidas no processo inflamatório, como monócitos inflamatórios ($F480^+Ly6C^{hi}$) e células mielóide-supressoras ($CD11b^+Gr1^+$) (MDSC), assim como os animais inoculados com 2×10^6 esporos, no caso de MDSCs (Figura 26). Além disso, esses dois grupos apresentaram maiores concentrações de células $CD19^+$, que estão diretamente envolvidas na resposta de anticorpos e, que por sua vez, podem polarizar a resposta imune para Th2, prejudicando a resposta celular desejada para o modelo vacinal utilizado neste trabalho. Ainda para o grupo 2×10^8 EV, houve um recrutamento significativo em relação aos demais grupos de células $CD11c^+$, presente na maioria das células dendríticas, mas também em monócitos, macrófagos e neutrófilos.

Figura 26 - Influxo celular após inoculação de diferentes quantidades de esporos de *B. subtilis* por via intraperitoneal

As células foram obtidas após lavagem intraperitoneal de camundongos C57BL/6 24 h após a inoculação de PBS, 2×10^6 , 2×10^7 ou 2×10^8 esporos vivos (EV). As células foram marcadas com diferentes anticorpos e fluorocromos e analisadas por citometria de fluxo. O gráfico representa um de dois experimentos independentes e mostra a média da porcentagem de células obtidas de dois animais por grupo. Significância estatística: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,005$; (****) $p < 0,0001$, versus grupo PBS (ANOVA).

Trabalhos anteriores mostram que esporos de *B. subtilis* podem ser utilizados como partículas adjuvantes eficazes capazes de induzir um aumento significativo da resposta imune sem a necessidade de conjugação a antígenos-alvo. Ainda, que a resposta induzida pela coadministração a antígenos vacinais se mostra balanceada

no que diz respeito aos perfis Th1 e Th2 – considerada igualmente ou mais importante para conferir proteção (BARNES et al., 2007).

Ensaio de ELISA com grupos imunizados com pgDE7h coadministrado aos esporos demonstraram que também há variação no título de anticorpos IgG específicos entre os grupos (Figura 27). Sob as condições testadas, a administração de 2×10^6 esporos induziu uma grande produção de anticorpos anti-E7 após 7 e 14 dias após a imunização, assim como IgG anti-gD no dia 14 em relação aos demais grupos. O grupo que recebeu 2×10^8 esporos também mostrou uma resposta alta de anticorpos anti-esporos e anti-gD (dia 7) quando comparada com a obtida para os demais. Entretanto, a imunização com 2×10^7 esporos coadministrados ao DNA se mostrou balanceada em relação aos títulos de IgG específicos que, juntamente com todos os dados mostrados anteriormente, corroboram para uma resposta com tendência ao tipo Th1, ideal para a obtenção de uma resposta antitumoral eficiente, como confirmado no ensaio de proteção terapêutica (Figura 24).

Figura 27 - Determinação dos títulos de IgG total específicos anti-E7, anti-gD e anti-esporos após imunização com diferentes concentrações de esporos

O soro dos animais foi coletado 7 e 14 dias (Dia 7 e Dia 14) após a imunização de dose única por via intramuscular com 40 μ g de pgDE7h misturados a 2×10^6 , 2×10^7 ou 2×10^8 esporos vivos (EV). O título de anticorpos foi obtido após ensaio de ELISA com o pool de soros de cinco animais por grupo. Os animais do grupo PBS receberam o desafio tumoral com as células TC-1, porém não foram imunizados. Os dados mostrados representam a média de dois experimentos independentes. Significância estatística: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$, (****) $p < 0,0001$, versus grupo PBS (ANOVA).

Os resultados de resposta humoral, juntamente com os anteriores demonstrados nesta segunda parte do trabalho mostraram que esporos de *B. subtilis* foram capazes de atuar como partículas adjuvantes eficientes quando coadministradas a uma vacina de DNA, gerando um aumento significativo na resposta imune celular específica e proteção anti-tumoral terapêutica *in vivo*,

tornando-se dessa maneira, uma alternativa promissora para futuras aplicações na terapia contra tumores associados ao HPV-16.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esporos de *B. subtilis* destacam-se no meio científico por apresentar inúmeras funcionalidades, dentre elas, sua utilização como adjuvantes particulados. Diversos trabalhos mostram que, tanto pela via de mucosa como por via parenteral, esporos são capazes de induzir um aumento na resposta imune contra diferentes tipos de antígenos proteicos, virais, provocando um aumento no título de anticorpos em modelos profiláticos de imunização. O presente trabalho é inédito, pois demonstra o efeito adjuvante de esporos vivos e inativados quando coadministrados a uma vacina de DNA de caráter terapêutico com aumento significativo na resposta celular específica e na proteção antitumoral *in vivo* em modelo de desafio extensamente utilizado na pesquisa de terapias contra tumores associados ao HPV-16. Além disso, foi possível demonstrar uma relação dose-efeito entre diferentes concentrações de esporos e evidenciar possíveis mecanismos por meio dos quais ocorre a exacerbação e tendência de respostas imunes envolvidas na adjuvantividade. Ainda, o presente trabalho consolidou de forma inédita a utilização de esporos inativados de *B. subtilis* como substitutos às micropartículas de ouro na administração intradérmica pelo método da biobalística. Essa abordagem provoca uma redução significativa nos custos e garante uma maior acessibilidade deste tipo de metodologia de entrega de plasmídeos, já licenciada e muito utilizada no campo da veterinária. Os resultados dos esporos como micropartículas para biobalística devem compor um pedido de patente e os dados de esporos como adjuvantes, um artigo científico de circulação internacional.

6 CONCLUSÕES

As principais contribuições feitas ao longo do presente trabalho foram as seguintes:

- esporos de *B. subtilis* são capazes de adsorver DNA plasmideal em sua superfície;
- esporos de *B. subtilis* podem ser utilizados como micropartículas carregadoras para biobalística em substituição às partículas de ouro usualmente empregadas, mantendo sua capacidade de produção de anticorpos e células T específicas;
- esporos de *B. subtilis* vivos e inativados são capazes de ativar células dendríticas *in vitro* e induzir a migração de células pró-inflamatórias *in vivo*;
- esporos de *B. subtilis* exercem um papel adjuvante quando coadministrados a vacina de DNA pgDE7h, resultando no aumento da proteção antitumoral e da resposta celular específica em modelo murino;
- o efeito adjuvante de esporos de *B. subtilis* depende de sua concentração, resultando em diferentes perfis de resposta humoral e celular, de indução de citocinas e de recrutamento local de alguns tipos celulares, os quais podem ser benéficos ou prejudiciais quando coadministrados a vacina terapêutica.

REFERÊNCIAS*

- AHMAD, S.; SWEENEY, P.; SULLIVAN, G. C.; TANGNEY, M. DNA vaccination for prostate cancer, from preclinical to clinical trials – where we stand? **Genetic Vaccines and Therapy**, v. 10, n. 9, 2012.
- BARNES, A. G. C.; CEROVIC, V.; HOBSON, P. S.; KLAVINSKIS, L. S. *Bacillus subtilis* spores: A novel microparticle adjuvant which can instruct a balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen. **European Journal of Immunology**, v. 37, p. 1538-1547, 2007.
- BARRY, M. A.; LAI, W. C.; JOHNSTON, S. A. Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization. **Nature**, v. 377, n. 6550, p. 632-635, 1995.
- BASEMAN, J. G.; KOUTSKY, L. A. The epidemiology of human papillomavirus infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. S16-S24, 2005. Suppl 1.
- BONTKES, H. J.; DE GRUIJL, T. D.; VAN DEN MUYSENBERG, A. J.; VERHEIJEN, R. H.; STUKART, M. J.; MEIJER, C. J.; SCHEPER, R. J.; STACEY, S. N.; DUGGAN-KEEN, M. F.; STERN, P. L.; MAN, S.; BORYSIEWICZ, L. K.; WALBOOMERS, J. M. Human papillomavirus type 16 E6/E7-specific cytotoxic T lymphocytes in women with cervical neoplasia. **Int. J. Cancer**, v. 88, p. 92-98, 2000.
- BORSATTO, A. Z.; VIDAL, M. L. B.; ROCHA, R. C. N. P. Vacina contra o HPV e a Prevenção do Câncer do Colo do Útero: Subsídios para a Prática. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 57, n. 1, p. 67-74, 2011.
- BOSCH, F. X. Epidemiology of human papillomavirus infections: new options for cervical cancer prevention. **Salud. Publica Mex.**, v. 45, p. S326-S339, 2003. Suppl 3.
- BOSCH, F. X.; MANOS, M. M.; MUÑOZ, N.; SHERMAN, M.; JANSEN, A. M.; PETO, J.; SCHIFFMAN, M. H.; MORENO, V.; KURMAN, R.; SHAH, K. V. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 87, n. 11, p. 796-802, 1995.
- CEROVIC, V.; JENKINS, C. D.; BARNES, A. G. C.; MILLING, S. W. F.; MACPHERSON, G. G.; KLAVINSKIS, L. S. Hyporesponsiveness of Intestinal Dendritic Cells to TLR Stimulation Is Limited to TLR4. **J. Immunol.**, v. 182, p. 2405-2415, 2009.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2003.

CHEUNG, T. C.; STEINBERG, M. W.; OBORENE, L. M.; MACAULEY, M. G.; FUKUYAMA, S.; SANJO, H.; D'SOUZA, C.; NORRIS, P. S.; PFEFFER, K.; MURPHY, K. M.; KRONENBERG, M.; SPEAR, P. G.; WARE, C. F. Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 106, n. 15, p. 6244-6249, 2009.

CIABATTINI, A.; PARIGI, R.; ISTICATO, R.; OGGIONI, M. R.; POZZI, G. Oral priming of mice by recombinant spores of *Bacillus subtilis*. **Vaccine**, v. 22, p. 4139–4143, 2004.

COTE, C. K.; ROOIJEN, N. V.; WELKOS, S. L. Roles of macrophages and neutrophils in the early host response to *bacillus anthracis* spores in a mouse model of infection. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 1, p.469-480, 2006.

DE JONG, A.; VAN POELGEEST, M. I.; VAN DER HULST, J. M.; DRIJFHOUT, J. W.; FLEUREN, G. J.; MELIEF, C. J.; KENTER, G.; OFFRINGA, R.; VAN DER BURG, S. H. Human papillomavirus type 16- positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. **Cancer Research**, v. 64, p. 5449-5455, 2004.

DINIZ, M. O.; FERREIRA, L. C. Sequência de ácido nucléico isolada, vetor de expressão, composição imunogênica sinérgica que compreende um vetor de expressão que codifica a proteína E7 do vírus do papiloma humano (HPV) fusionada a proteína gD do vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e um vetor de expressão que codifica uma citocina e seus usos. Número do depósito no PCT: PCT/BR2010/000290, 2010. Número da publicação: WO2011026206 A1

DINIZ, M. O.; FERREIRA, L. C. S. Enhanced anti-tumor effect of a gene gun-delivered DNA vaccine encoding the human papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to the herpes simplex virus glycoprotein D. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 44, n. 5, p. 421-427, 2011.

DINIZ, M. O.; CARIRI, F. A. M. O.; APS, L. R. M. M.; FERREIRA, L. C. S. Enhanced therapeutic effects conferred by an experimental DNA vaccine targeting human papillomavirus-induced tumors. *Human Gene Therapy*, v.24, n.10, p. 861-870, 2013.

DINIZ, M. O.; LASARO, M. O.; ERTL, H. C.; FERREIRA, L. C. Immune responses and therapeutic antitumor effects of an experimental DNA vaccine encoding human papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to herpesvirus glycoprotein D. *Clin. Vaccine Immunology*, v. 17, n. 10, p. 1576-1583, 2010.

EBRAHIM, S. H.; MCKENNA, M. T.; MARKS, J. S. Sexual behaviour: related adverse health burden in the United States. **Sex. Transm. Infect.**, v. 81, p. 38-40, 2005.

FELTKAMP, M. C.; SMITS, H. L.; VIERBOOM, M. P.; MINNAAR, R. P.; DE JONGH, B. M.; DRIJFHOUT, J. W.; TER SCHEGGET, J.; MELIEF, C. J.; KAST, W. M. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, p. 2242-2249, 1993.

FERREIRA, M. G. R.; CARVALHO, C. H. S.; CARNEIRO, A. A.; CÁRDENAS, F. E. N. Introdução de genes em segmentos foliares de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum schumm.*) usando biobalística. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 279-280, 2004.

FLORES, K. J.; CRAIG, M.; WANEKAYA, A.; DONG, L.; GHOSH, K.; SMITH, J. J.; DELONG, R. K. Tipping the Proteome with Gene-Based Vaccines: Weighing in on the Role of Nanomaterials. **Journal of Nanotechnology**, 2012.

FOERSTER, H. F.; FOSTER, J. W. Endotrophic calcium, strontium, and barium spores of *Bacillus megaterium* and *Bacillus cereus*. **Journal of Bacteriology**, v. 91, n. 3, p. 1333-1344, 1966.

GARCIA, F.; PETRY, K. U.; MUDERSPACH, L.; GOLD, M. A.; BRALY, P.; CRUM, C. P.; MAGILL, M.; SILVERMAN, M.; URBAN, R. G.; HEDLEY, M. L.; BEACH, K. J. ZYC101a for treatment of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. **Obstet. Gynecol.**, v. 103, p. 317-326, 2004.

HASSETT, D. E.; WHITTON, J. L. DNA immunization. **Trends Microbiol.**, v. 4, n. 8, p. 307-312, 1996.

HÖPFL, R.; HEIM, K.; CHRISTENSEN, N.; ZUMBACH, K.; WIELAND, U.; VOLGGER, B.; WIDSCHWENDTER, A.; HAIMBUCHNER, S.; MÜLLER-HOLZNER, E.; PAWLITA, M.; PFISTER, H.; FRITSCH, P. Spontaneous regression of CIN and delayedtype hypersensitivity to HPV-16 oncoprotein E7. **Lancet**, v. 356, p. 1985–1986, 2000.

HUANG, J-M.; HONG, H. A.; TONG, H. V.; HOANG, T. H.; BRISSON, A. Mucosal delivery of antigens using adsorption to bacterial spores. **Vaccine**, v. 28, p. 1021-1030, 2010.

HUNG, C. F.; MONIE A.; ALVAREZ R. D. DNA vaccines for cervical cancer: from bench to bedside. **Exp. Mol. Med.**, v. 39, p. 679-689, 2007.

IWAMOTO, S.; IWAI, S-I.; TSUJIYAMA, K.; KURAHASHI, C.; TAKESHITA, K.; NAOE, M.; MASUNAGA, A.; OGAWA, Y.; OGUCHI, K.; MIYAZAKI, A. TNF- α drives human CD14⁺ monocytes to differentiate into CD70⁺ dendritic cells evoking Th1 and Th17 responses. **J. Immunol.**, v. 179, p.1449-1457, 2007.

JENSON, A. B.; KURMAN, R. J.; LANCASTER, W. D. Tissue effects and host response to human papillomavirus infection. **Dermatol. Clin.**, v. 9, p. 203-209, 1991.

KIM, J. W.; HUNG, C. F.; JUANG, J.; HE, L.; KIM, T. W.; ARMSTRONG, D. K.; PAI, S. I.; CHEN, P. J.; LIN, C. T.; BOYD, D. A.; WU, T. C. Comparison of HPV DNA vaccines employing intracellular targeting strategies. **Gene Therapy**, v. 11, p. 1011-1018, 2004.

KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; WU, R.; SANFORD, J. C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, London, v. 327, p. 70-73, 1987.

KUTZLER, M. A; WEINER, D. B. DNA vaccines: ready for prime time? **Nature Reviews**, v. 9, p. 776-78, 2008.

LASARO, M. O.; DINIZ, M. O.; REYES-SANDOVAL, A.; ERTL, H. C.; FERREIRA, L. C. S. Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from human herpes virus-1. **Microbes Infect.**, v. 7, p.1541–1550, 2005.

LI, A. V.; MOON, J. J.; ABRAHAM, W.; SUH, H.; ELKHADER, J.; SEIDMAN, M. A.; YEN, M.; IM, E-J.; FOLEY, M. H.; BAROUCH, D. H.; IRVINE, D. J. Generation of effector memory T cell–based mucosal and systemic immunity with pulmonary nanoparticle vaccination. **Sci. Transl. Med.**, v. 5, n. 204 (204ra130), 2013.

LIANG, J.; FU, J.; KANG, H.; LIN, J.; YU, Q.; YANG, Q. The stimulatory effect of TLRs ligands on maturation of chicken bone marrow-derived dendritic cells. **Vet. Immunol. Immunop.**, 2013.

LIN, K. Y.; GUARNIERI, F. G.; STAVELEY-O'CARROLL, K. F.; LEVITSKY, H. I.; AUGUST, J. T.; PARDOLL, D. M.; WU, T. C. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. **Cancer Research**, v. 56, n. 1, p. 21-26, 1996.

MA, B.; XU, Y.; HUNG, C.; WU, T. C. HPV and therapeutic vaccines: where are we in 2010? **Current Cancer Therapy Reviews**, v. 6, p. 81-103, 2010.

MANNELLO, F.; LIGI, D.; CANALE, M. Aluminium, carbonyls and cytokines in human nipple aspirate fluids: Possible relationship between inflammation, oxidative stress and Breast cancer microenvironment. **J. Inorg. Biochem.**, 2013

MATHIAS-SANTOS, C.; RODRIGUES, J. F.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; CONNELL, T. D.; FERREIRA, L. C. F. Distinctive immunomodulatory and inflammatory properties of the Escherichia coli type II heat-labile enterotoxin LT-IIa and its B pentamer following intradermal administration. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 8, p. 1243–1251, 2011.

NONAKA, K.; SAIO, M.; SUWA, T.; FREY, A. B.; UMEMURA, N.; IMAI, H.; OUYANG, G-F.; OSADA, S.; BALAZS, M.; ADANY, R.; KAWAGUCHI, Y.; YOSHIDA, K.; TAKAMI, T. Skewing the Th cell phenotype toward Th1 alters the maturation of tumor-infiltrating mononuclear phagocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, 2008.

O'HAGAN, D.; SINGH, M.; UGOZZOLI, M.; WILD, C.; BARNETT, S.; CHEN, M.; SCHAEFER, M.; DOE, B.; OTTEN, G. R.; ULMER, J. B. Induction of potent immune responses by cationic microparticles with adsorbed human immunodeficiency virus DNA vaccines. **Journal of Virology**, v. 75, n. 19, p. 9037-9043, 2001.

PACCEZ, J. D.; LUIZ, W. B.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; FERREIRA, R. C. C.; SCHUMANN, W.; FERREIRA, L. C. S. Stable episomal expression system under control of a stress inducible promoter enhances the immunogenicity of *Bacillus subtilis* as a vector for antigen delivery. **Vaccine**, v.24, p. 2935–2943, 2006.

PARK, Y.-J.; SONG, B.; KIM, Y.-S.; KIM, E.-K.; LEE, J.-M.; LEE, G.-E.; KIM, J.-O.; KIM, Y.-J.; CHANG, W.-S.; KANG, C.-Y. Tumor microenvironmental conversion of natural killer cells into myeloid-derived suppressor cells. **Cancer Research**, July 2013.

POLLARA, G.; JONES, M.; HANDLEY, M. E.; RAJPOPAT, M.; KWAN, A.; COFFIN, R.S.; FOSTER, G.; CHAIN, B.; KATZ, D. R. Herpes simplex virus type-1-induced activation of myeloid dendritic cells: the roles of virus cell interaction and paracrine type I IFN secretion. **J. Immunol.**, v. 173, p. 4108-4119, 2004.

SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. **Journal of Particulate Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 27-37, 1987.

SONG, M.; HONG, H. A.; HUANG, J. M.; COLENUUTT, C.; KHANG, D. D.; GUYEN, T. V. A.; PARK, S. M.; SHIM, B. S.; SONG, H. H.; CHEON, I. S.; JANG, J. E.; CHOI, J.; CHOI, Y. K.; STADLER, K.; CUTTING, S. M. Killed *Bacillus subtilis* spores as a mucosal adjuvant for an H5N1 vaccine. **Vaccine**, v. 30, p. 3266-3277, 2012.

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. **Curr. Microbiol.**, v.66, p.279–285, 2013.

TRIMBLE, C.; LIN, C. T.; HUNG, C. F.; PAI, S.; JUANG, J.; HE, L.; GILLISON, M.; PARDOLL, D.; WU, L.; WU, T. C. Comparison of the CD8+ T cell responses and antitumor effects generated by DNA vaccine administered through gene gun, biojector, and syringe. **Vaccine**, v. 21, n. 25-26, p. 4036-4042, 2003.

VILLA, L. L.; AULT, K. A.; GIULIANO, A. R.; COSTA, R. L.; PETTA, C. A.; ANDRADE, R. P.; BROWN, D. R.; FERENCZY, A.; HARPER, D. M.; KOUTSKY, L. A.; KURMAN, R. J.; LEHTINEN, M.; MALM, C.; OLSSON, S. E.; RONNETT, B. M.; SKJELDESTAD, F. E.; STEINWALL, M.; STOLER, M. H.; WHEELER, C. M.; TADDEO, F. J.; YU, J.; LUPINACCI, L.; RAILKAR, R.; MARCHESE, R.; ESSER, M. T.; BRYAN, J.; JANSEN, K. U.; SINGS, H. L.; TAMMS, G. M.; SAAH, A. J.; BARR, E. Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18. **Vaccine**, v. 24, p. 5571-5583, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/INSTITUT CATALÀ D'ONCOLOGIA (WHO/ICO). Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Cancers in World. Summary Report 2009. Disponível em: <www.who.int/hpvcentre>. Acesso em: 07 Jun. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/INSTITUT CATALÀ D'ONCOLOGIA (WHO/ICO). Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Cancers in Brazil. Summary Report 2009. Disponível em: <www.who.int/hpvcentre>. Acesso em: 07 Jun. 2013.

YU, L. H.; CUTTING, S. M. The effect of anti-spore antibody responses on the use of spores for vaccine delivery. **Vaccine**, v.27, p.4576–4584, 2009.

ZANONI, I.; OSTUNI, R.; CAPUANO, G.; COLLINI, M.; CACCIA, M.; RONCHI, A. E.; ROCCHETTI, M.; MINGOZZI, F.; FOTI, M.; CHIRICO, G.; COSTA, B.; ZAZA, A.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; GRANUCCI, F. CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation. **Nature**, v. 460, p. 264-268, 2009.