

ADSORÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES EM ESPOROS DE *Bacillus subtilis* COMO POTENCIAL PLATAFORMA VACINAL

NATÁLIA SILVA PERES¹; ANA VITÓRIA COSTA²; NEIDA LUCIA CONRAD³;
VITÓRIA SEQUEIRA GONÇALVES ZORZI⁴; CAROLINA PELLIZER DI
GIACOMO⁵; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – nataliaapeeres@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas – anavitoriacost4@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – conradneida@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – vitoriasgon@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – carolinapdigiacomo@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Vacinas de subunidades, são baseadas em fragmentos específicos de um patógeno e são mais atrativas para o mercado em relação às vacinas tradicionais devido a segurança apresentada (O'HAGAN; PAPUOLI, 2004). A ausência de moléculas responsáveis pela ativação do sistema imune, faz com que a resposta imunológica induzida por vacinas de subunidades não seja eficiente para um adequado estímulo imunológico (ZAMAN; TOTH, 2013). Logo se faz necessário o uso de estratégias para incremento da resposta imune, como a utilização de microrganismos probióticos como adjuvantes vacinais para modular o sistema imunológico e melhorar a resposta vacinais. Essa abordagem vem gerando resultados positivos como demonstrado por Roos *et al.*, 2018 e Maubrigades *et al.*, 2020.

Bacillus subtilis é uma bactéria Gram-positiva que vive no solo (DUC, *et al.*, 2004), possui o status **Generally Regarded as Safe** (GRAS) pelo U.S Food and Drug Administration (FDA). O gênero *Bacillus* é um dos principais gêneros que possui a capacidade de formar endósporos (PIMENTEL *et al.*, 2016). Quando em condições de escassez de nutrientes, iniciam um processo de desidratação e formam uma parede rígida que envolve o citoplasma e material genético bacteriano (BROCK, 2012). Os esporos bacterianos sobrevivem por longos períodos em condições adversas de temperatura, umidade, falta de nutrientes e são flexíveis quanto a necessidade de oxigênio (TORTORA *et al.*, 2013).

A utilização de esporos como adjuvantes vacinais pode ser conduzida de diferentes formas. Como demonstrado por Santos *et al.*, 2021, a vacinação de ovinos associada a suplementação oral de microrganismos probióticos (*Bacillus toyonensis* e *Saccharomyces boulardii*) resultou em aumentos de 24 e 14 vezes nos níveis de IgG total sérica quando comparados ao grupo controle. No estudo de Malbrigue *et al.*, 2020, camundongos que receberam uma vacina recombinante contra a glicoproteína D BoHV-5 (rgD) associada a esporos de *B. toyonensis* adsorvidos a hidróxido de alumínio apresentaram níveis mais elevados de IgG total no soro, sugerindo que os esporos amplificaram a resposta imune específica contra rgD.

Também é possível explorar a adjuvantividade apresentada pelos esporos utilizando outros dois métodos. A partir da construção de um esporo recombinante que irá expressar o antígeno de interesse ou através da adsorção de antígenos na superfície dos esporos. A técnica de adsorção se mostra adequada para

apresentação de antígenos em superfícies de mucosas, tanto em humanos quanto em animais (ISTICATO; RICCA, 2014; RICCA *et al.*, 2014).

O objetivo deste trabalho é de avaliar a adsorção de antígenos recombinantes derivados de *Lawsonia intracellularis* e do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) em esporos de *Bacillus subtilis* e explorar seu potencial como plataforma vacinal.

2. METODOLOGIA

2.1 Produção dos esporos

A obtenção dos esporos de *Bacillus subtilis* AZ54 iniciou-se com a semeadura de alíquotas armazenadas previamente em glicerol em meio Luria Bertani (LB) Ágar, incubado a 37 °C por 16 horas, sendo realizada coloração de Gram para avaliação de pureza da cultura. Colônias de *B. subtilis* foram transferidas para um frasco com 30 ml de caldo LB e incubadas sob agitação (120 rpm) a 37 °C por 16 horas. Após esse período, o conteúdo foi transferido para um frasco contendo 100 ml de caldo *Nutrient Yeast Extract Salt Medium* (NYSM) modificado e incubado sob agitação (120 rpm) a 37 °C por 72 horas, para indução da esporulação. A pureza do cultivo foi avaliada por coloração de Gram e semeadura em meios Infusão de cérebro e coração (BHI), Sabouraud. Após, os esporos foram purificados conforme o protocolo de Santos *et al.*, (2020).

2.2 Adsorção das proteínas recombinantes em esporos de *Bacillus subtilis*

O protocolo de adsorção de antígenos recombinantes em esporos de *Bacillus subtilis* foi conduzido utilizando duas proteínas derivadas de *Lawsonia intracellularis* (N1 e N2) e uma proteína derivada do hormônio liberador de gonadotrofinas (G1) em diferentes concentrações. N1 e N2 foram avaliadas em 50 µg/µl, enquanto G1, em 10 µg/µl. O processo envolveu a centrifugação de esporos a 12.000 x *g* por 10 minutos e os *pellets* foram suspensos em citrato de sódio 50 mM (pH 4.0). Ambos foram mantidos a 37 °C por 1 hora e centrifugados a 12.000 x *g* por 10 minutos. O conteúdo sobrenadante de cada *pellet* foi retirado e armazenado em um novo tubo de 1,5 ml, sobrenadante e *pellet* das diferentes adsorções foram devidamente identificados e armazenados à 4 °C.

2.3 Avaliação da adsorção

Foi realizada eletroforese em gel SDS-PAGE a 12%, utilizando amostras dos *pellets* e sobrenadantes de cada adsorção. O gel foi corado com corante Coomassie Blue para análise. Posteriormente, foi realizada a técnica de *Western blot* com a finalidade de caracterização das proteínas utilizando anticorpos específicos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na coluna 3 do SDS-PAGE (Fig. 1A) é possível observar a presença de uma banda correspondente a massa molecular da proteína N1 (24,20 kD), indicando assim a adsorção do antígeno aos esporos de *Bacillus subtilis*. Na coluna 2, a falta de bandas confirma a adsorção completa do antígeno aos

esporos de *B. subtilis*. Como esperado, na coluna 5 não é possível observar a presença da banda correspondente a massa molecular de N2 (76,30 kD). A coluna 3 (Fig. 1B) apresenta uma banda correspondente a adsorção da proteína G1 (18 kD) e a coluna 2 (Fig. 1B) não possui bandas, esses resultados demonstram que a adsorção do antígeno em esporos de *B. subtilis* ocorreu.

As colunas 3 e 6 (Fig. 2), correspondem a adsorção das proteínas N1 e N2 respectivamente, apresentam bandas que indicam que a adsorção dos antígenos ocorreu. Nas colunas 2 e 5 podemos avaliar que a ausência de bandas reforça a adsorção completa das duas moléculas proteicas citadas em esporos de *Bacillus subtilis*. A adsorção de G1 não pode ser confirmada através do *Western Blot* devido à ausência de bandas na coluna 8.

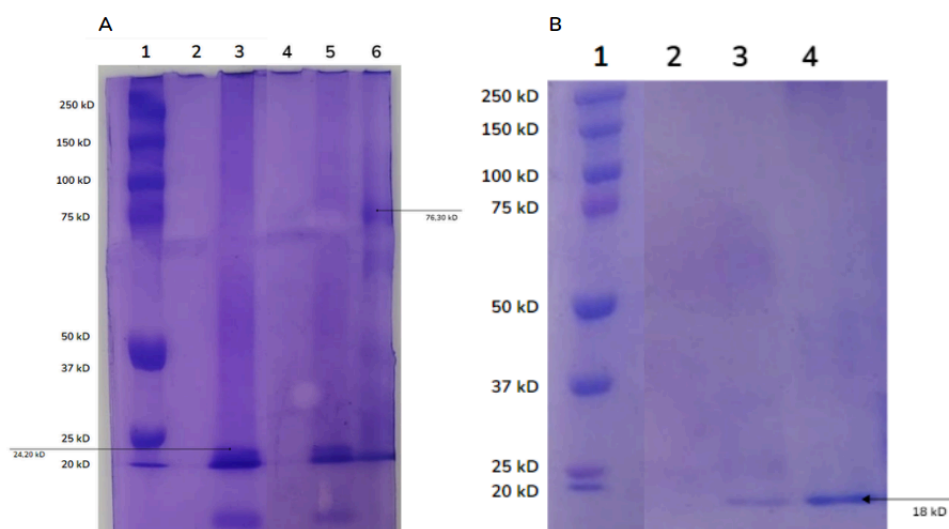


Figura 1. Eletroforese em gel SDS-PAGE. A figura demonstra a adsorção de antígenos recombinantes em esporos de *Bacillus subtilis*. A. (1) Marcador (Bio-Rad); (2) Sobrenadante da adsorção de N1 (50 ug/ul); (3) Adsorção de N1 (50 ug/ul); (4) Sobrenadante da adsorção de N2 (50 ug/ul); (5) Adsorção de N2 (50 ug/ul); (6) N2. B. (1) Marcador (Bio-Rad); (2) Sobrenadante da adsorção de G1 (10 ug/ul); (3) Adsorção de G1 (10 ug/ul); (4) G1.

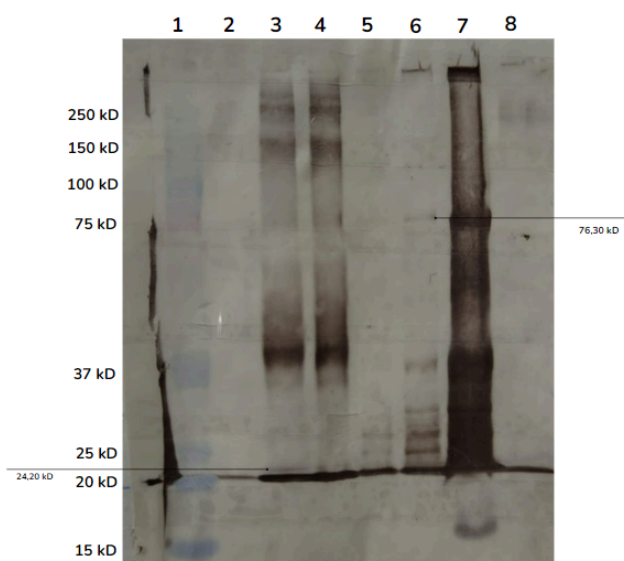


Figura 2. Western Blot. A figura demonstra a adsorção de antígenos recombinantes em esporos de *Bacillus subtilis*. (1) Marcador (Bio-Rad); (2) Sobrenadante da adsorção de N1 (50 ug/ul); (3) Adsorção de N1 (50 ug/ul); (4) N1; (5) Sobrenadante da adsorção de N2l (50 ug/ul); (6) Adsorção de N2 (50 ug/ul); (7) N2; (8) Adsorção de G1 (10 ug/ul).

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo confirmam a adsorção de diferentes antígenos recombinantes em esporos de *Bacillus subtilis*, confirmando seu potencial como plataforma vacinal. Como perspectiva futura desta pesquisa, esta plataforma será avaliada *in vivo* como meio de entrega de antígenos vacinais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, K. C. S.; ALMEIDA, M. E. M.; GLÓRIA, J. C. *et al.* *Bacillus subtilis*: uma versátil ferramenta biotecnológica. **Scientia Amazonia**, Manaus, v. 7, n. 2, p. 15-23, 2018.

DUC, L. H. *et al.* Intracellular fate and immunogenicity of *B. subtilis* spores. **Vaccine**, [s.l.], v. 22, n. 15-16, p. 1873-1885, 2004. DOI: 10.1016/j.vaccine.2003.11.021

ISTICATO, R.; RICCA, E. Spore Surface Display. **Microbiology Spectrum**. Washington, D.C, v. 2, n. 5, 2014. DOI: 10.1128/microbiolspec.TBS-0011-2012.

PIMENTEL, I. C.; DIONÍSIO, J. A.; SIGNOR, D. Bactérias Esporuladas. *In*: DIONÍSIO, J. A. *et al.* **Guia Prático de Biologia do Solo**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2016, p. 23-26.

MAUBRIGADES, L. R. *et al.* Association of *Bacillus toyonensis* spores with alum improves bovine herpesvirus 5 subunit vaccine immune response in mice. **Vaccine**, [s.l.], v. 38, n. 51, p. 8216 - 8223, 2020. DOI: 10.1016/j.vaccine.2020.10.066

RICCA, E. *et al.* Mucosal vaccine delivery by non-recombinant spores of *Bacillus subtilis*. **Microbial Cell Factories**, [s.l.], v. 12, p. 13-115, 2014. DOI: 10.1186/s12934-014-0115-2

SANTOS, *et al.* A probiotic treatment increases the immune response induced by the nasal delivery of spore-adsorbed TTFC. **Microbial cell factories**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 1-13, 2020. DOI: 10.1186/s12934-020-01308-1

TAVARES, M.B. *et al.* *Bacillus subtilis* Endospores at High Purity and Recovery Yields: Optimization of Growth Conditions and Purification Method. **Current Microbiology**, New York, v. 66, n. 3, p. 279–285, 2013. DOI: 10.1007/s00284-012-0269-2

WANG, H; WANG, Y; YANG, R. Recent progress in *Bacillus subtilis* spore-surface display: concept, progress, and future. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 101, p. 933-949, 2017. DOI: 10.1007/s00253-016-8080-9