

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

KÉSSIA CAROLINE SOUZA ALVES

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL ESTIMULADA POR
PROBIÓTICO CONTENDO A 'PROTEÍNA 1' DE SUPERFÍCIE DE
MEROZOÍTO DE *Plasmodium falciparum* (Pf-MSP1-19)**

**Manaus - AM
2018**

KÉSSIA CAROLINE SOUZA ALVES

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL ESTIMULADA POR
PROBIÓTICO CONTENDO A 'PROTEÍNA 1' DE SUPERFÍCIE DE
MEROZOÍTO DE *Plasmodium falciparum* (Pf-MSP1-19)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Luis André Morais Mariúba

Manaus-AM

2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A474a Alves, Késsia Caroline Souza
Avaliação da resposta humoral estimulada por probiótico contendo a 'Proteína 1' de Superfície De Merozoíto de Plasmodium falciparum (pf-MSP1-19) / Késsia Caroline Souza Alves. 2018
77 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Luís André Morais Mariúba
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Bacillus subtilis. 2. esporos. 3. Malária;. 4. Pf-MSP1-19. I. Mariúba, Luís André Morais II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

KÉSSIA CAROLINE SOUZA ALVES

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL ESTIMULADA POR
PROBIÓTICO CONTENDO A 'PROTEÍNA 1' DE SUPERFÍCIE DE
MEROZOÍTO DE *Plasmodium falciparum* (Pf-MSP1-19)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

APROVADA EM: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Luís André Morais Mariúba, Presidente Instituto Leônidas Maria Deane -
FIOCRUZ Amazônia**

**Prof. Dr. Allyson Guimarães da Costa- Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia
do Amazonas- HEMOAM**

Prof. Dr. Diogo Pereira de Castro, Instituto Leônidas Maria Deane - FIOCRUZ Amazônia

*À minha família, pelo apoio e incentivo.
Ao meu noivo Wagner, meu companheiro de todas as
horas, pela paciência, amor, compreensão e
incentivo.
Ao meu orientador Luís André Mariúba pela
paciência, apoio e ensinamentos.
À Maria Edilene Martins por toda ajuda desde
sempre e carinho.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, o qual é minha Fortaleza, por sua bondade e misericórdia em minha vida, toda honra e toda glória dedico à Ele.

Aos meus pais Ivan Cesário e Suely Souza, e minha irmã Ingridy Karine Souza Alves por estarem sempre ao meu lado me apoiando desde sempre, tudo que sou é graças à vocês, e tudo o que faço é por vocês, minha eterna gratidão às pessoas mais importantes da minha vida.

Ao meu noivo Wagner por toda paciência, compreensão e companheirismo. Por estar sempre ao meu lado me dando forças e me apoiando.

Ao Dr. André Mariúba, pela orientação, paciência, compreensão e preocupação em todos os momentos, serei eternamente grata por tudo.

À Juliane Corrêa Glória pela amizade, desde a graduação. Por toda a ajuda e parceria nos momentos difíceis, pelas gargalhadas e longas conversas de laboratório.

À Maria Edilene Martins por ser além de uma colega de trabalho um ombro amigo acolhedor. Obrigada por toda ajuda dentro e fora do laboratório, minha gratidão à você não cabe em mim.

À Fernanda Batalha, pela amizade e parceria desde a graduação.

Aos meus amigos Lorrane, Diego, minha pequena Ester e Jeniffer por trazerem sempre mais alegria para minha vida e por toda ajuda e amizade.

Aos colegas Daniele farias, Paula Takita e Diogo Castro por todas as histórias e risadas compartilhadas.

Aos amigos que o Mestrado me trouxe, Felipe Guedes, João Verçosa, Aline Rubens, Anny barbosa, Carlos Dannel, Bruno Gensen, Aline brilhante. Obrigada pelos momentos de descontração, e por juntos vencermos os obstáculos sempre com muita alegria e cumplicidade.

Aos amigos e colegas de Laboratório, Yury, Danielle, Alessandra, Wellington, Walter, Emmily, Felipe, Natália, Karoline por compartilharem trabalhos, alegrias e aflições. Obrigada por tornarem os dias de trabalho mais leves e divertidos.

Ao professor Dr. Gemilson Pontes por toda ajuda e consultoria na realização deste projeto.

À Universidade Federal do Amazonas pela graduação.

Ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação Biotecnologia e a todos os seus integrantes pela oportunidade de concretização deste trabalho.

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD/FIOCRUZ-AM por propiciar a realização deste projeto de pesquisa.

Ao XXII Seminário Laveran & Deane sobre Malária pela oportunidade a mim dada de apresentar meu trabalho à tantos especialistas em malária e pelas críticas feitas que colaboraram imensamente para este trabalho.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM) e pelo apoio financeiro ao projeto. A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste sonho.

*Não fui eu que ordenei a
você? Seja Forte e corajoso!
Não desanime, pois o Senhor, o
seu Deus, estará com você por
onde você andar (Josué 1:9)*

RESUMO

Introdução: *Bacillus subtilis* é uma bactéria Gram-positiva, não patogênica, que recebeu o status GRAS (*Generally Regarded As Safe*) pelo FDA Americano. Quando exposta à situação adversa o *B. subtilis* produz um tipo de célula morfológicamente distinta, denominada de esporo. Pesquisas têm destacado o potencial do uso de esporos como *delivery* vacinal, sendo estes capazes de estimular respostas imunes sistêmicas e localizadas, promovendo ainda elevação da resposta humoral quando coadministrado com antígenos acoplados ou integrados à superfície dos esporos. Atualmente, ainda não há uma vacina eficaz para o combate à malária e dentre os antígenos estudados, a proteína *Pf-MSP1-19* de *Plasmodium falciparum* se mostra um dos mais promissores e elucidados candidatos vacinais. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo principal avaliar a resposta imune frente ao antígeno *rPf-MSP1-19* de *Plasmodium falciparum*, presente na superfície dos esporos de *Bacillus subtilis*. **Materiais e métodos:** Para isso, foram realizadas separação por renografia e quantificação por citometria de fluxo dos esporos de *Bacillus subtilis* recombinados com *rPf-MSP1-19* e esporos *Wild Type* (WT), seguido pelo acoplamento químico da *rPf-MSP1-19* à superfície dos esporos WT autoclavados. Com as ferramentas produzidas, camundongos Balb/c foram imunizados via oral e intraperitoneal e os soros obtidos avaliados por ELISA indireto. **Resultados:** Neste trabalho o acoplamento químico utilizando EDC e NHS se mostrou o melhor método para adsorção da proteína *rPf-MSP1-19* à superfície de esporos. Uma nova abordagem para quantificação de esporos foi aplicada usando Citometria de Fluxo e *Beads* Trucount™ demonstrando maior potencial de eficiência e sensibilidade. Foi observado que houve a degradação da proteína *rPf-MSP1-19* quando expressa diretamente na superfície do esporo, pelo método recombinante. Quanto as imunizações orais, não foi possível obter resposta imune frente ao antígeno acoplados aos esporos quimicamente e nem a *Bacillus subtilis* recombinante. Entretanto as imunizações intraperitoneais induziram níveis elevados de IgG anti- *rPf-MSP1-19* no grupo imunizado com *rPf-MSP1-19* acoplada à superfície dos esporos WT autoclavados semelhante ao controle positivo. Sugerindo o uso de esporos de *B. subtilis* *Wild Type* autoclavados como alternativa de *delivery* e de adjuvante de antígenos para imunizações com fins experimentais, podendo no futuro ser aplicado em imunizações em humanos.

Palavras-chaves: *Bacillus subtilis*; esporos; Malária; *Pf-MSP1-19*.

ABSTRACT

Introduction: *Bacillus subtilis* is a Gram-positive, non-pathogenic bacterium that receive the status GRAS (Generally Regarded As Safe) by the American FDA. When exposed to the adverse situation *B. subtilis* produces a morphologically distinct cell type, called the spore. Research has highlighted the potential of use spores as vaccines delivery, which are capable of stimulate systemic and localized immune responses, promoting the elevation of humoral response when coadministered with antigens coupled or integrated to the surface of spores. Currently, there is still no effective vaccine to combat malaria and among the antigens studied, the *Pf*-MSP1-19 protein of *Plasmodium falciparum* is one of the most promising and elucidated vaccine candidates. Against the foregoing, the main objective of this study was to evaluate the immune response against *Plasmodium falciparum* r*Pf*-MSP1-19 antigen, present on the surface of *Bacillus subtilis* spores. **Methods:** For this, renografin separation and quantification by flow cytometry of *Bacillus subtilis* spores recombined with r*Pf*-MSP1-19 and Wild Type (WT) spores were performed, followed by chemical coupling of r*Pf*-MSP1-19 to the surface of the autoclaved WT spores. With the tools produced, Balb / c mice were immunized orally and intraperitoneally and the sera obtained were evaluated by indirect ELISA. **Results and conclusion:** In this work the chemical coupling using EDC and NHS proved to be the best method for the adsorption of the r*Pf*-MSP1-19 protein at spore surface. A new approach to spore quantification was applied using Flow Cytometry and Trucount™ Beads demonstrating high efficiency and sensitivity. It was observed that there was degradation of the r*Pf*-MSP1-19 protein when expressed directly on the spore surface by the recombinant method. As for oral immunizations, it was not possible to obtain immune response against the antigen coupled to the spores chemically and to recombinant *Bacillus subtilis*. However, intraperitoneal immunizations induced elevated levels of anti- r*Pf*-MSP1-19 IgG in the group immunized with r*Pf*-MSP1-19 coupled to the surface of the autoclaved WT spores similar to the positive control. Suggesting the use of autoclaved wild type *B. subtilis* spores as an alternative delivery and antigen adjuvant for experimental immunizations, which may in the future be applied in immunizations in humans.

Key Words: *Bacillus subtilis*; spores; Malaria; *Pf*-MSP1-19

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Distribuição geográfica mundial de infecção por Malária.....	18
Figura 2. Mapa de risco da malária no Brasil de acordo com IPA- 2016.	19
Figura 3. (A) Ciclo de vida do parasita da malária <i>P. falciparum</i>	20
Figura 4. Invasão do merozoíto ao eritrócito.	21
Figura 5. Processamento de clivagem da rPf-MSP1-19.	23
Figura 6. Diagrama mostrando o progresso da esporulação de <i>Bacillus subtilis</i> e exibição dos esporos em sete estágios.....	27
Figura 7. Ultraestrutura de esporo de <i>Bacillus subtilis</i> . As três subunidades básicas que o compõe: núcleo, córtex e capas.....	28
Figura 8. Esporulação da <i>Bacillus subtilis</i> observadas por microscopia em objetiva 10x100. ...	40
Figura 9. Gráfico de leitura de esporos utilizando <i>Trucount beads</i>	412
Figura 10. Análise, em software <i>FlowJo</i> , do acoplamento da proteína estreptavidina na superfície dos esporos, por adsorção física.....	43
Figura 11. Análise, por <i>software FlowJo</i> , do acoplamento por adsorção covalente da proteína estreptavidina na superfície de esporos.	445
Figura 12: Gráfico de cromatografia por afinidade em equipamento Akta Purifier General Elector	
Figura 13. Gel de SDS-PAGE à 15% referente à concentração da proteína rPf-MSP1-19 em coluna Amicon® Ultra.....	467
Figura 14. <i>Western-blot</i> das ferramentas utilizadas	478
Figura 15. Reatividade dos soros de camundongos imunizados com a bactéria <i>Bacillus subtilis</i> recombinante, com o esporo acoplado à rPf-MSP1-19 e controles rPf-MSP1-19 e esporos <i>Wild Type</i> , frente ao antígeno rPf-MSP1-19.....	489
Figura 16. Reatividade dos soros de camundongos imunizados por via intraperitoneal.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos adjuvantes em desenvolvimento ou uso.....	24
------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

D.O	Densidade Ótica
EDC	1-[3-(diamino)propil-3-etilcarbodiimida
ELISA	Ensaio Imuno Enzimático
FDA	<i>Food and drug Administration</i>
IPTG	Isopropílico β -D-1-thiogalactopyranoside
LB	Luria Bertani
MSP	Proteína de Superfície de Merozoíto
NHS	N-hydroxysulfosuccinimide
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PAGE	Eletroforese em gel de Poliacrilamida
rPf-MSP1-19	Proteína de superfície de merozoíto 1 (fração de 19kDa) recombinante de <i>Plasmodium falciparum</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
WHO	<i>World Health Organization</i>
OMS	Organização mundial da saúde
DTT	Dithiothreitol
MSP	Proteína de Superfície de Merozoíto
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1.1 Epidemiologia	17
1.2 Ciclo da Malária.....	19
1.2.1 Invasão do merozoito.....	21
1.4 Vacinas Contra Malária	23
1.5 Adjuvantes	24
1.6 Esporos de <i>Bacillus subtilis</i>	26
1.6.1 Esporos como adjuvantes vacinais.....	29
2. OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo Geral	32
2.2 Objetivos Específicos.....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Aspectos Éticos	33
3.2 Obtenção e separação dos esporos.....	33
3.3 Cultivo e indução da proteína <i>rPf</i> -MSP1-19	33
3.4 Purificação da proteína recombinante	34
3.5 Análise da Purificação e concentração da proteína recombinante.....	35
3.6 Quantificação dos esporos purificados por Citometria de fluxo.....	35
3.7 Caracterização Do Esporo Recombinante.....	35
3.8 Adsorção do antígeno na superfície dos esporos	36
3.9 Imunização Dos Camundongos Com As Ferramentas Produzidas.....	36
3.9.1 Imunizações Oraís	37
3.9.2 Imunizações intraperitoneais.....	37
3.10 ELISA Indireto.....	38
3.11 Análises de dados estatísticos	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 Obtenção dos esporos.....	40
4.2 Padronização da quantificação por Citometria de Fluxo	41
4.3 Padronização do Acoplamento.....	42
4.4 Cromatografia por afinidade e SDS-PAGE da <i>rPf</i> -MSP1-19.....	45
4.5 Caracterização das ferramentas produzidas	46
4.6 Ensaios de imunização oral	47
4.7 Ensaios de imunizações intraperitoneais.....	49
5. CONCLUSÃO.....	52

6. PERSPECTIVAS	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXOS.....	60
ANEXO 01 – Aprovação do Comitê de Ética INPA.....	60
ANEXO 2 – Artigo de revisão	61
ANEXO 03 – Artigos publicados durante o Mestrado.	75

INTRODUÇÃO

O *Bacillus subtilis* é uma bactéria Gram-positiva que possui o Status GRAS (*Generally Regarded as Safe*), dada pelo FDA americano (*Food and Drug administration*) às espécies consideradas seguras para uso em humanos. É um dos microrganismos mais utilizados na indústria e microbiologia aplicada. Há relatos da utilização desta bactéria que datam mais de mil anos no Japão, onde a mesma era utilizada na fermentação da soja resultando na produção do *natto*, consumido na alimentação, também foi muito utilizada como imunestimulante para auxiliar no tratamento de doenças gastrointestinais, além disso foi consumida como probiótico por mais de 50 anos. (SCHALLMEY et al., 2004, NOVELLI et al., 1982).

O *B. subtilis* quando submetido a um ambiente não favorável ao seu crescimento produz uma forma morfológica distinta, chamada de esporo (WANG et al., 2017), estes são capazes de resistir a condições extremas, como altas e baixas temperaturas, radiação e inexistência de nutrientes, o que facilita seu transporte e armazenamento (NICHOLSON et al., 2000). A estrutura rígida e compacta dos esporos permite que proteínas sejam ancoradas ou expressas na superfície dos mesmos (STICATO & RICCA, 2014).

Há duas formas principais para ancorar proteínas a superfície dos esporos, o método recombinante, que consiste na fusão do gene de um antígeno heterólogo a um gene de proteína de superfície do esporo, onde as proteínas de superfície mais utilizadas para essa finalidade são CoTC e CotB, ou o método não recombinante onde, uma proteína de interesse purificada é incubada junto aos esporos de *B. subtilis*, ocorrendo assim uma ligação estável da proteína à superfície dos mesmos (RICCA et al., 2014; DUC et al., 2003).

Estudos vêm demonstrando a utilização de esporos acoplados a antígenos como *delivery* vacinal, dentre eles já foram testados com sucesso para antígenos de Rotavírus (LEE et al., 2010), Tuberculose (DAS et al., 2016), Tétano (BARNES et al., 2007; MAURIELLO et al., 2004), Clonorquíase (WU et al., 2017), dentre outros.

Uma vez observado o potencial desses esporos como *delivery* vacinal em diferentes doenças e tendo em vista que a malária ainda é considerada um grande problema de saúde pública, principalmente os casos notificados pelo parasita *P. falciparum*, responsável por 99% dos óbitos da malária mundialmente (OMS. 2017). Este trabalho utilizou a fração C-terminal de 19 kDa da Proteína de Superfície de Merozoíto 1 (MSP1-19) de *Plasmodium falciparum*

para avaliar o potencial dos esporos nesta finalidade, sendo este antígeno um promissor candidato vacinal para doença.

A proteína *Pf*-MSP1-19 é expressa no final do ciclo eritrocítico do parasita a partir de um precursor de aproximadamente 200 kDa ancorada à superfície do mesmo, após sofrer duas clivagens enzimáticas, apenas o fragmento de 19 kDa da MSP1 permanece ancorado à superfície do merozoíto (BLACKMAN et al. 1990;1991; O'DONNELL et al. 2000; GILSON et al. 2006;). Estudos *in vitro* e em primatas, apontam que a *Pf*-MSP1-19 pode ser reconhecida por anticorpos inibidores de invasão e de crescimento, onde os anticorpos impedem o processamento secundário da proteína, evento esse essencial para a entrada do parasita aos eritrócitos e conseqüentemente para sua sobrevivência (BLACKMAN et al. 1990; 1994 ; COOPER et al. 1992; EGAN et al. 1999; O'DONNELL et al. 2000 ; 2001 ; WOEHLBIER et al. 2006; BURNS et al. 2016).

Visto a amplitude da utilização de esporos de *B. subtilis* como *delivery* vacinal para inúmeras doenças, além do fato do antígeno *Pf*-MSP1-19 ser um dos mais promissores antígenos candidatos vacinais para malária, este trabalho teve por objetivo maior, avaliar a resposta imune humoral frente à *rPf*-MSP1-19 ancorado a superfície de esporos de *B. subtilis*. Esta pesquisa está inserida em um projeto amplo que visa analisar a capacidade de antígenos vacinais de malária, apresentados através dessa ferramenta, de produzir anticorpos funcionas capazes de inibir a invasão *in vitro* e *in vivo* de *P. falciparum*.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Epidemiologia

A malária é uma infecção sanguínea causada por um protozoário do gênero *Plasmodium*, este é transmitido de um humano para outro através da picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles*. A predominância das infecções é causada pelos *P. vivax* e *P. falciparum*. Atualmente a mortalidade devido a malária tem ocorrido quase que exclusivamente pelo *Plasmodium falciparum* (OMS, 2017).

As infecções mais comuns são causadas por *P. vivax*, entretanto as infecções por essa espécie são menos fatais. Contudo tanto *P. vivax* quanto *P. falciparum* podem causar perda sanguínea grave, causando anemia, além disso as infecções por *Plasmodium falciparum*, apesar de menor incidência, acarretam grande preocupação, devido este ser responsável pela forma mais grave da Malária em adultos e crianças, podendo progredir para o quadro de Malária cerebral. Isso ocorre devido a característica do parasita *P. falciparum*, no estágio sanguíneo, de ser capaz de evitar a depuração pelo baço, dos glóbulos vermelhos infectados (iRBCs), através do sequestro na vasculatura do tecido (RIGGLE et al., 2017), além disso outro agravante desse parasita é o fato do mesmo possuir afinidade por hemácias em qualquer estágio de maturação, elevando os níveis de parasitemia e resultando em sintomas mais agudos (GILLES, 2002). Sendo assim, os casos de malária causados por *P. falciparum* requerem grande atenção, visto que este é capaz de desencadear as formas mais graves da doença e dos óbitos consequentes destas complicações, principalmente em crianças de até 5 anos nas regiões da África subsaariana (TUTEJA, 2007; WASSMER et al., 2015; OMS, 2017).

As cinco espécies de parasitas da malária que infectam humanos, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium knowlesi* (OMS, 2013), compartilham de alguns sintomas como episódio febris com tendência à ataques periódicos, incluindo calafrios, sudorese, além disso, também apresentam sintomas comuns com outras doenças infecciosas, incluindo dores no corpo, dor de cabeça, náuseas, fraqueza geral e prostração. Quando não tratadas as infecções são caracterizadas por aumento do baço (CARTER; MENDIS, 2002; OMS, 2013).

Desde 2000, houve um progresso em relação a diminuição dos casos de malária em todo o mundo. No início de 2016 a malária foi considerada endêmica em 91 países e territórios, abaixo dos registrados em 2000 que eram de 108 países (Figura 1), entretanto, apesar do progresso em relação ao combate à doença, a malária continua tendo um impacto devastador

na saúde mundial. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2016 foram registados cerca de 216 milhões de casos de malária no mundo, com 445 mil mortes sendo principalmente crianças menores de 5 anos no território Africano (OMS, 2017).

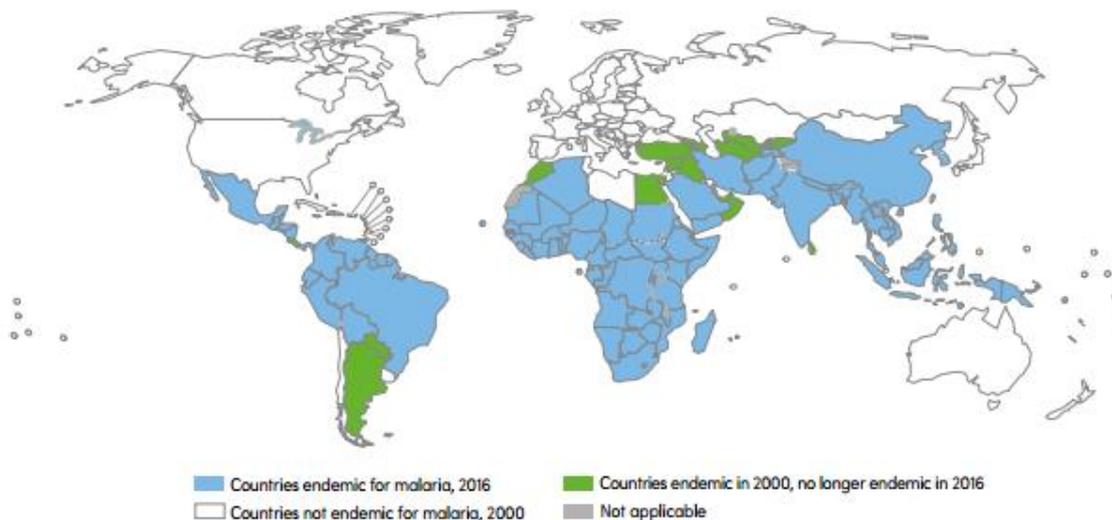


Figura 1: Distribuição geográfica mundial de infecção por Malária

Fonte: WHO, 2016

No Brasil, a incidência de malária vem diminuindo anualmente desde 2005. Em 2016 foram confirmados cerca de 175 mil casos de malária (OMS, 2017), sendo o *Plasmodium vivax* responsável por 88% dos casos, contra 12% causados por *Plasmodium falciparum* e menos de 1% para *Plasmodium malariae* (BRASIL, 2016) sendo que a distribuição endêmica está localizada na região da Amazônia legal que engloba os estados do Amazonas, Acre, Amapá, Maranhã, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e Mato Grosso (HERMES et al., 2013). Na A figura 2 é possível observar a distribuição das áreas de risco no Brasil e sua transmissão no ano de 2016. As áreas podem ser classificadas: em alto risco (IPA maior que 49.9 casos/ 1.000 Hab), médio risco (entre 10 e 49.9 casos /1.000 Hab) e baixa (de 0,1 a 9,9 casos/ 1000 Hab (BRASIL, 2017).

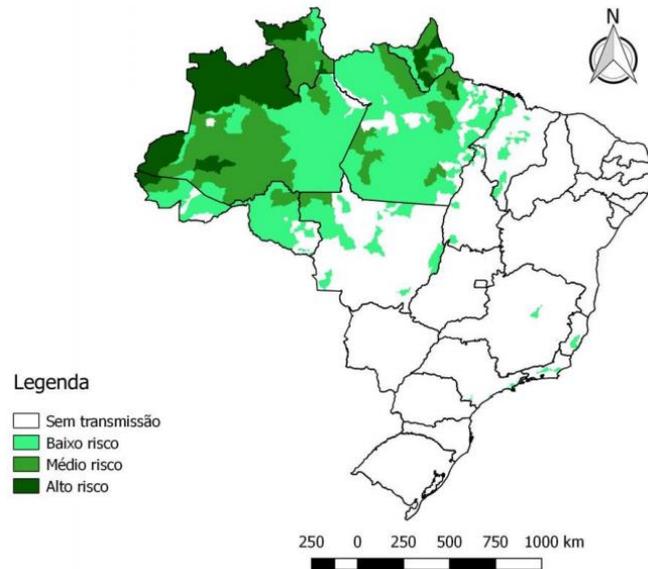


Figura 2. Mapa de risco da malária no Brasil de acordo com IPA- 2016.

Fonte: Brasil, 2017

1.2 Ciclo da Malária

O ciclo de vida do parasita da malária é bastante complexo e requer expressão de proteínas específicas para a sobrevivência do mesmo em ambos os hospedeiros, estas são necessárias tanto para sobrevivência intracelular quanto extracelular do parasita, invasão dos hepatócitos e hemácias e para evasão das respostas imunes do hospedeiro. Uma vez dentro do hospedeiro humano tanto os esporozoítos de *P. falciparum* quanto *P. malarie* desencadeiam esquizogonia imediata, já os esporozoítos de *P. ovale* e *P. vivax* podem iniciar uma esquizogonia imediata ou levar à esquizogonia tardia (TUTEJA, 2007). O ciclo (Figura 3A), pode ser dividido em várias etapas, iniciando pela entrada dos esporozoítos no sangue do hospedeiro humano através da picada do mosquito.

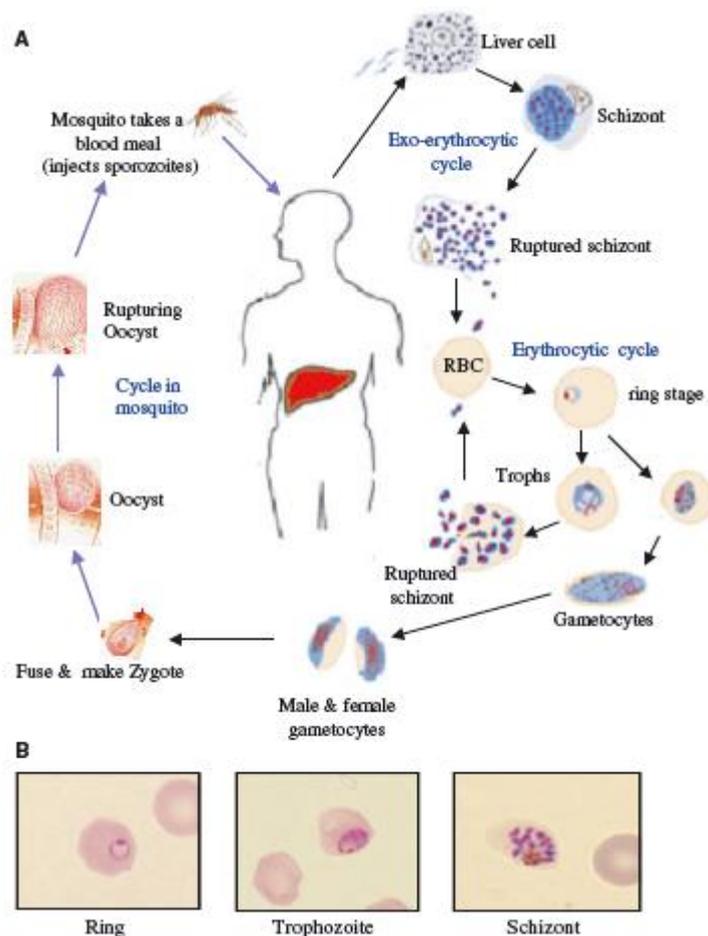


Figura 3. (A) Ciclo de vida do parasita da malária *P. falciparum*. (B) diferentes estágios intraeritrocitário do *P. falciparum* em cultura.

Fonte: TUTEJA, 2007

Os esporozoítos infectantes presentes na glândula salivar do mosquito *Anopheles* são injetados no hospedeiro humano, acreditava-se que ao ocorrer a picada os esporozoítos moviam-se imediatamente afastando-se do local da picada, entretanto um estudo realizado por Yamauchi et al. (2007) utilizando uma espécie de parasita roedor (*Plasmodium yoelii*) estabeleceram a cinética dessa migração e observaram que a maioria dos esporozoítos ainda permaneciam na região da derme por pelo menos uma hora após a infecção, indicando assim duas possibilidades: a migração dos esporozoítos do local de inserção e/ou a distribuição dos parasitos pelas células de proteção do hospedeiro (AMINO et al., 2006).

Após a infecção da corrente sanguínea do hospedeiro humano, os esporozoítos de *P. falciparum* chegam aos hepatócitos do fígado onde permanecem por 9-16 dias onde fazem reprodução assexuada, também conhecida como esquizogonia exoeritrocítica. O mecanismo pelo qual ocorre a segmentação e a invasão dos hepatócitos ainda não está bem elucidada,

entretanto, estudos demonstram que a migração do esporozoítos através de vários hepatócitos, no hospedeiro mamífero, é essencial para a conclusão do ciclo de vida (MOTA et al., 2001). Cada esporozoítos pode dar origem à vários merozoítos, dentro do hepatócito, e cada merozoítos pode invadir um glóbulo vermelho, quando liberado do fígado para corrente sanguínea. (TUTEJA, 2007).

1.2.1 Invasão do merozoito

Os merozoítos entram nos eritrócitos por uma invasão complexa (Figura 4) que pode ser dividida em quatro fases: a primeira é o reconhecimento e ligação reversível do merozoítos no eritrócito de baixa afinidade; o segundo estágio é a reorientação da formação de junções entre a extremidade apical do merozoítos (ligação irreversível) e a liberação de substâncias das organelas de *rhoptria* e micronema, levando a formação do vacúolo parasitóforo; a terceira fase é caracterizada pelo movimento de junção e invaginação da membrana eritrocítica em torno do merozoítos, associada à remoção da superfície do merozoítos; e por último o fechamento das membranas do vacúolo parasitóforo, após conclusão da invasão do merozoítos ao eritrócito (MILLER et al., 2002; COWMAN & CRABB, 2006).

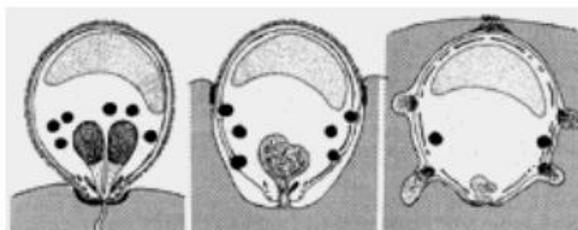


Figura 4. Invasão do merozoítos ao eritrócito. Ocorre a formação de uma junção de membrana que se move em direção ao interior da célula enquanto o merozoítos é internalizado e a formação de um vacúolo parasitóforo.

Fonte: PREISER et al., 2000

A reprodução assexuada inicia dentro do eritrócito, e lá, os parasitas se desenvolvem em diferentes estágios. A fase de trofozoítos precoce é muitas vezes referida como a ‘forma de anel’ (Figura 3B), nesta o aumento do trofozoítos é muitas vezes acompanhada por uma alta atividade metabólica além de processo de glicólise e a ingestão de citoplasma do hospedeiro (MILLER et al., 2002).

O fim desse estágio, os trofozoítos sofrem repetidas divisões nucleares sem citocineses resultando na formação de esquizontes (Figura 3A). Cada esquizonte contém cerca de 20 merozoítos, sendo estes liberados após a lise das células vermelhas do sangue, para assim, invadir outras células. Esta fase é que ocorre os sintomas da doença. Este ciclo

intraeritrocitário repetitivo de invasão, multiplicação, liberação e invasão, continua levando cerca de 48h em *P. falciparum* (TUTEJA, 2007).

Nas infecções por *P. vivax* ou *P. ovale*, alguns parasitas se desenvolvem lentamente ficando em estado de latência no fígado, sendo denominados hipnozoítos. Estes podem ser ativados meses após a infecção e retornar ao ciclo hepático, ocasionando as recaídas da doença (BRASIL, 2010).

Uma pequena parcela de trofozoítos contidos nos eritrócitos, se diferenciam, eventualmente, em gametócitos (Figura 3A) (machos e fêmeas), os quais não possuem nenhuma atividade dentro do hospedeiro humano. Estes ao serem ingeridos por anofelinos durante o repasto sanguíneo, iniciam o ciclo sexuado do parasito no mosquito, o qual inclui a liberação de gametas masculinos e femininos, a fertilização, e a formação de um oocineto, que, após atravessar o epitélio intestinal do mosquito, diferencia-se em oocisto, a forma replicativa. Quando o oocisto é rompido libera milhares de esporozoítos, os quais migram e invadem as glândulas salivares do inseto vetor, ali ficam contidos até serem inoculados em um hospedeiro vertebrado, reiniciando o ciclo (MUELLER et al., 2009).

A proteína 1 de superfície de merozoíto, (MSP1) é uma classe importante de proteínas integrais de membrana dos merozoítos em desenvolvimento e livres. A MSP1 está envolvida no reconhecimento inicial dos merozoítos aos eritrócitos através de interações com resíduos de ácido siálico, e estudos demonstraram que anticorpos produzidos contra a esta proteína podem bloquear o processo de invasão (COWMAN, 2002). Esta proteína é sintetizada durante a fase de esquizogonia do parasita e apresenta massa molecular variando entre 190-210 kD de acordo com a espécie (BLACKMAN et al., 1991). Em *P. falciparum* a MSP1 é produzida na forma de um precursor de 190 kDa, e no fim da esquizogonia a mesma é clivada em polipeptídios de diferentes tamanhos. Pelo menos quatro desses polipeptídeos de tamanhos aproximados: 83kDa, 28-30 kDa, 38 kDa e 42 kDa estão presentes na formação de um complexo não-covalente que se associa a superfície do parasita, (HOLDER et al., 1992; HOLDER, 2009). Assim que o merozoíto é liberado na corrente sanguínea ocorre uma nova clivagem somente no fragmento de 42kDa, gerando dois fragmentos, um de 33 kDa (MSP1-33) e outro de 19 kDa (MSP1-19). O fragmento de 33 kDa é liberado na circulação, juntamente com o restante do complexo, enquanto o fragmento de 19 kDa (MSP1-19) permanece ligado na superfície do merozoíto pela âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI) e participa da invasão do eritrócito. O processamento da MSP1, está ilustrada na Figura 5 (BLACKMAN et al., 1990; FERREIRA et al., 2003).

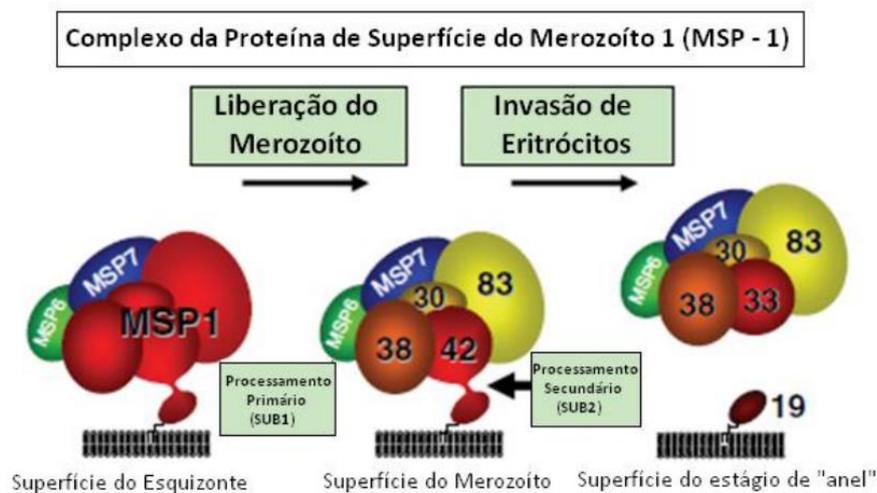


Figura 5. Processamento de clivagem da MSP1-19.

Fonte: Adaptada de HOLDER, 2009.

A proteína MSP1-19 está presente na região C-terminal do gene MSP1, sendo conservada tanto em *Plasmodium falciparum* (FERREIRA et al., 2003), quanto em *Plasmodium vivax* (PUTAPORNTIP et al., 2002). Sabe-se que a *Pf*-MSP1-19 é reconhecida por anticorpos inibidores de invasão e anticorpos inibidores de crescimento, onde algumas imunoglobulinas inibitórias agem impedindo o processamento secundário da MSP1, um evento essencial para a sobrevivência do parasita (BLACKMAN et al., 1990; 1994; COOPER et al., 1992; EGAN et al, 1999 ; O'DONNELL et al ., 2000 ; 2001 ; WOEHLBIER et al ., 2006). Além disso, anticorpos anti- *Pf*-MSP1-19 de *P. falciparum* naturalmente adquiridos, foram avaliados através de estudos soropidemiológicos, no qual associaram esses anticorpos à proteção contra infecção por *P.falciparum*, demonstrando assim a importância de anticorpos direcionados contra esta região da proteína (EGAN et al., 1996; BRANCH et al., 2000; BRAGA et al., 2002; MORAIS et al. 2005). Um estudo de Burns e colaboradores (2016) demonstrou que anticorpos anti- *Pf*-MSP1-19, produzidos em macacos, mostraram habilidade de inibir o crescimento do *P. falciparum* na fase sanguínea, certificando este como um dos mais promissores antígenos vacinais para vacina antimalárica.

1.4 Vacinas Contra Malária

O desenvolvimento de uma vacina contra malária, vem se mostrando um grande desafio para ciência, pois foi demonstrado que era possível o desenvolvimento de uma, há 43 anos (MATA et al., 2013).

Segundo Mata et al., 2013, uma das razões que dificulta o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o *Plasmodium* é a capacidade do mesmo de fugir da resposta imune do

hospedeiro. Esta capacidade se deve ao fato dos parasitas apresentarem um ciclo de vida complexo, com diferentes formas, diversidade genética e variação antigênica, permitindo que o parasita se mantenha vivo dentro do hospedeiro sem que haja uma resposta imune eficaz (FERREIRA et al., 2004). Devido a isso, uma resposta imune mais adequada para obter proteção do hospedeiro contra a malária, seria a que ativasse uma resposta humoral e celular.

Quando se trata de desenvolvimento de vacinas um fator importante a ser considerado são os imunostimulantes, para Mata e colaboradores (2013) as pesquisas têm focado na identificação de antígenos, entretanto sabe-se que é importante avaliar como um antígeno é apresentado, assim como o efeito imunostimulatório dos componentes da formulação.

A vacina contra malária que mais conseguiu avanço até hoje foi direcionada para o estágio pré-eritrocítico, chamada de RTS,S, também conhecida como *Mosquirix*, sendo utilizado como adjuvante *AS01* (AIDE et al., 2010; AGNANDJI et al., 2011; 2012). A vacina oferece proteção parcial de 30% em crianças pequenas, sendo realizada em quatro doses e no momento avaliada na África subsaariana como uma ferramenta complementar de controle para a doença (OMS, 2017).

A vacina RTS,S já tinha sido testada anteriormente utilizando adjuvante *AS02*, porém não foi bem sucedida, isto implica que houve casos em que bons antígenos de malária foram abandonados, devido ao uso de adjuvantes inadequados, dessa forma diminuindo assim sua imunogenicidade (YAGI et al., 2014). Por isso há a necessidade, além de identificar um bom antígeno, selecionar um bom adjuvante que será usado para induzir a resposta imune junto ao mesmo.

1.5 Adjuvantes

A palavra Adjuvante, vem do latim *adjuvare*, que significa, “para ajudar”. É aplicado à vacina para aumentar ou modular a resposta imune de uma maneira específica. Os adjuvantes possuem o potencial de ajudar a validar vacinas contra patógenos aos quais não existem vacinas atuais, principalmente para vacinas produzidas a partir de um antígeno recombinante ou DNA, visto que estes geralmente não provocam uma resposta protetora quando utilizados sozinhos, e tendem a ser pouco imunogênicas. Além disso, os adjuvantes também são capazes de prolongar o fornecimento de uma vacina, permitindo a conservação da dose do antígeno vacinal ou reduzindo o número de imunizações necessárias para gerar e manter respostas imunitárias protetoras. (GELLIN; SALISBURY, 2015).

Descobertas científicas sugerem que a autoimunidade pode ser desencadeada por adjuvantes vacinais, dos quais os compostos por alumínio (hidróxido de alumínio e fosfato) foram os mais estudados e utilizados, permitem um reconhecimento mais fácil e eficaz do que não pertencente ao corpo (GUIMARÃES et al., 2015).

Ainda segundo Guimarães et al., (2015) os adjuvantes têm causado alguns problemas ao serem administrados, desencadeando uma nova síndrome, denominada de síndrome autoimune/inflamatória induzida por adjuvantes (ASIA). Esta síndrome provoca uma série de reações que podem ir da mais leve à mais graves, estas reações são atribuídas à estimulação dos adjuvantes utilizados.

Atualmente os adjuvantes aprovados para vacinas humanas são: sais não cristalinos à base de hidróxido de alumínio (*Alum*), MF59 em algumas vacinas virais, (*Monophosphoryl Lipid A* (MPL), *AS04*, *AS01B* e *AS02A* contra doenças virais e parasitárias, virossomas para o vírus da Hepatite B (HBV), vírus do papiloma humano (HPV), vírus da Hepatite A (HAV), e coleratoxina para cólera, na Tabela 1, e possível observar os adjuvantes mais utilizados. Os adjuvantes podem ser compostos por vários constituintes, atualmente foram descritos adjuvantes à base de óleo, virossomas, relacionados com TLR (TLRs), MPL, feitos de dinucleotídeos CpG não metilados e tuftisina (ISRAELI et al., 2009).

Talvez a indicação mais clara da importância do adjuvante no aumento da resposta imune vem do estudo de malária humana de fase II da GSK. Neste estudo, demonstraram que a formulação lipossômica de MPL e um adjuvante de saponina (QS21), formando o *AS01*, oferecia uma melhor proteção contra o parasita do que uma formulação em emulsão dos mesmos componentes (MATA et al., 2013).

Vários adjuvantes já foram testados em inúmeras tentativas de desenvolvimento de vacinas, utilizando diversos antígenos. Alguns adjuvantes já foram testados para malária: Alum, sem evidência de resposta protetora e baixa imunidade (GRAVES; GELBAND, 2006); MF59, também não apresentando resposta protetora, e baixa quantidade de anticorpos (KARIUKI et al., 2005). O adjuvante AS03 testado em combinação com a vacina em estudo RTS's, estimulou uma resposta de anticorpos forte em pacientes saudáveis, porém, apenas uma moderada eficácia protetora (STOUTE et al., 1997); entre outros (MATA et al., 2013).

Tabela 1. Tipos adjuvantes em desenvolvimento ou uso.

Fonte: MATA et al., 2013

Type of Adjuvants	Name of compound	Vaccines in test or use
Related to Toll like receptors (TLRs)	Aluminum hydroxide and phosphate	PCV7, PCV13, MenC, HPV, HAV, Hib; tetanus vaccine
	IC31 ASO4 (MPL+ QS-21), ASO2A (MPL+ Alum), CPG 7907, and GM-CSF RD-529, ISS, Flagellin TLR agonists	Influenza [14] Papilloma virus, hepatitis B, malaria [15]
Oil based emulsions	CFA, IFA, MF59™ montanide, adjuvant 65, lipovant, QS-21 [16] ISCOMs, ADVAX™, algammulin	Influenza
Xenobiotic adjuvants	Unmethylated CpG dinucleotides [17]	Hepatitis B, allergens, tumor cells
Tuftsia auto adjuvant	Tuftsia	Influenza, malaria , autoimmune encephalomyelitis, restoration of innate immune system (HIV patients), SLE [18–21]

CFA: complete freund adjuvant; IFA: incomplete freund adjuvant; PCV: pneumococcal conjugated vaccine; MenC: meningitis C; HPV: human papilloma Virus; HAV: hepatitis A virus; Hib: haemophilus influenza type b.

A combinação mais bem sucedida corresponde as formulações contendo sistema de adjuvante (AS). De fato, o AS04 aumenta a resposta humoral e celular, o AS02 produziu 33% de proteção em ensaios clínicos de malária em campo usando o antígeno RTS's, após 12 meses (AIDE et al., 2010), o AS01 demonstrou uma melhora a resposta do AS02 apresentando respostas terapêuticas mais fortes mediadas por células e aumento de proteção contra malária (KESTER et al., 2009).

Apesar de muitos êxitos, o desenvolvimento de vacinas para alguns patógenos, estão atualmente restritas às respostas imunes limitadas frente aos antígenos vacinais. Isto requer uma série de novas abordagens para o desenvolvimento de vacinas eficaz e põe em destaque o crescente papel que os adjuvantes desempenham nessas vacinas (GELLIN; SALISBURY, 2015).

1.6 Esporos de *Bacillus subtilis*

O *Bacillus subtilis* é uma bactéria gram-positiva, amplamente utilizada na produção de enzimas extracelulares em escala mundial. Possui atratividade industrial devido a várias

razões como, sua alta taxa de crescimentos em ciclos curtos, além de seu status GRAS (generally regarded as safe), dado a espécies consideradas seguras e não patogênicas para humanos (SCHALLMEY et al., 2004). Quando exposta à um meio que apresenta deficiência de nutrientes, as células de *B. subtilis* produzem um tipo de célula morfológicamente distinta, denominada esporo (WANG; WANG; YANG, 2017), a estrutura típica do esporo de *B. subtilis* pode ser observada na figura 6.

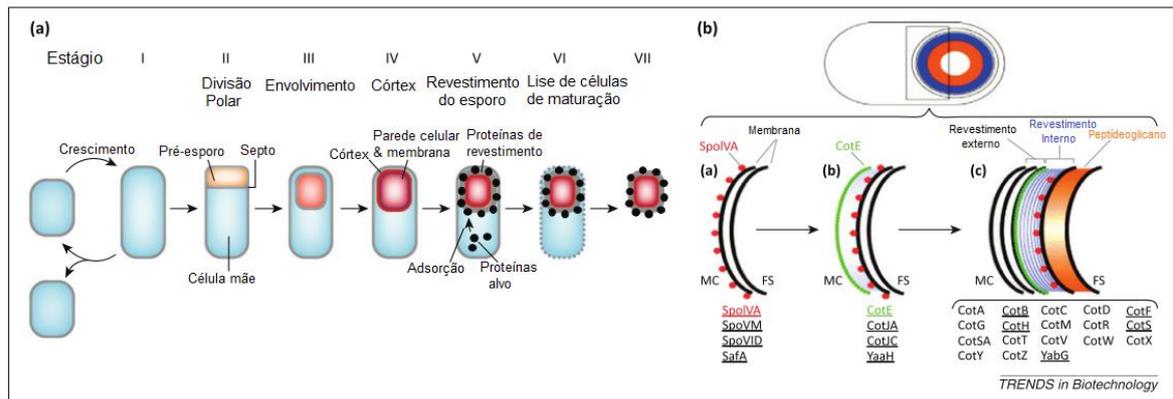


Figura 6. Diagrama mostrando o progresso da esporulação de *Bacillus subtilis* e exibição dos esporos em sete estágios. **A)** Etapas de esporulação e formação dos esporos. **B)** Visão mais detalhada das proteínas de revestimento do esporo durante o processo de maturação.

Fonte: Adaptado de DRIKS, 2002.

O processo de formação dos esporos é dividido em sete estágios (I à VII indicados na figura 6a). No estágio 0, ocorre a duplicação do genoma da célula. A diferenciação inicia com formação do filamento axial (estágio I), com posterior desenvolvimento do septo (estágio II) que tem dois compartimentos, a célula mãe (maior) e o pré-esporo (menor). Em seguida a célula mãe engloba o pré-esporo (estágio III), após o processo de englobamento ocorre a formação e montagem das camadas que irão compor o esporo maduro. Nos estágios IV, V, e VI, ocorrem a deposição do córtex e formação do exósporo, a estruturação da capa e outros possíveis componentes externos como a crosta respectivamente. No estágio final (estágio VII), a parede celular do esporângio é lisada, desse modo liberando o esporo maduro no ambiente. Esses esporos são facilmente ativados dando início novamente ao ciclo vegetativo em resposta à presença de nutrientes. De modo geral as ultraestruturas básicas mais descritas nos esporos são: núcleo, córtex e capas (Figura 7) (DRIKS, 2002).

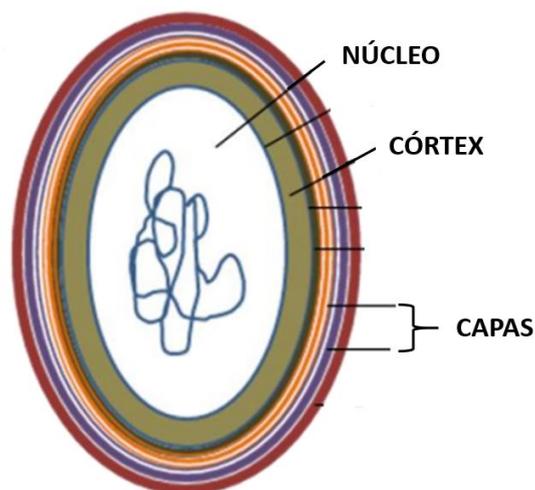


Figura 6. Ultraestrutura de esporo de *Bacillus subtilis*. As três subunidades básicas que o compõe: núcleo, córtex e capas.

Fonte: Adaptado de CAVALCANTE, 2014.

Os esporos de *Bacillus subtilis* estão envoltos por um revestimento protetor constituído por uma camada interior e uma externa, sendo estas compostas por mais de 70 proteínas diferentes. Estas proteínas de revestimento são sintetizadas dentro das células-mãe esporulantes, e são depositadas na superfície dos esporos a medida que os pré-esporos emergem (Figura 6b) (PAN; KIM; YUN, 2012). As proteínas de revestimento são sintetizadas no citoplasma celular circundante e expostas em camadas sobre a superfície do esporo, como mostrado no estágio V da figura 6A. O interior do compartimento dos esporos abriga o cromossomo. Este compartimento é formado por duas membranas no início da esporulação (DRIKS, 2002). Desta forma, a formação de proteínas de fusão com proteínas de revestimento é um método fácil de exibição (KIM; SCHUMANN, 2009).

Das proteínas de revestimento que são mais utilizadas para o método de exibição na superfície do esporo, destacam-se as proteínas de revestimento CotB e CotC sendo as mais utilizadas para produção de proteínas heterólogas (DUC & CUTTING, 2003; ISTICATO et al., 2001).

Os esporos de *B. subtilis*, possuem a vantagem de oferecer propriedades de resistência únicas, e são capazes de sobreviver por longos períodos de tempo sob condições extremas de estresse, como alta temperatura, dessecação, ausência de nutrientes e exposição a solventes químicos, tais características, facilitam o armazenamento e o transporte dos esporos. Tais propriedades são conferidas aos esporos graças a sua composição química e ultraestrutura (DE SOUZA et al., 2014).

1.6.1 Esporos como adjuvantes vacinais

As vacinas representam a forma mais eficazes de prevenção de doenças. Entretanto, as atuais vacinas licenciadas, induzem apenas uma imunidade abaixo do desejado, exigindo assim, muito esforço para induzir uma resposta imune protetora. Um fator importante a ser considerado para o desenvolvimento de uma vacina, são imunoestimulantes. Segundo Mata et al. (2013), grande parte dos pesquisadores tem focado seus estudos na identificação do antígeno, mas também avaliar como um antígeno é apresentado, assim como o efeito imunoestimulatório dos componentes da formulação da vacina. Isso indica a necessidade crítica de adjuvantes mais eficazes, capazes de proporcionar de modo eficiente a produção de células específicas B e T de memória (BARNES et al., 2007).

Um estudo de BARNES et al., 2007, mostrou que os esporos de *B. subtilis*, aumentam de forma eficiente populações de células CD4+ e CD8+ contra o antígeno utilizado (TT: tetanus toxoid fragmente C). Além disso, observaram que a os esporos utilizados como adjuvantes, induziram uma resposta *T helper*, sendo elevada por repetidas doses com esporos. Foi observado ainda que administração via nasal, levou o aumento de IgA de mucosa e IgG sistêmico contra o antígeno administrado. O estudo concluiu que os esporos podem ser utilizados como um novo adjuvante de modo eficaz, sem que haja a necessidade de acoplar o esporo quimicamente com o antígeno alvo, além disso, os esporos induzem o aumento da resposta imune contra os antígenos quando administrada via de mucosa ou sistêmica.

Um outro estudo que também utilizou como antígeno o Fragmento C da toxina do tétano (TTFC), expresso em esporos de *B. subtilis* pela fusão com a proteína de membrana dos esporos, Cot C. O estudo também utilizou a subunidade B da toxina termolábil de *E. coli* (LTB). As imunizações intraperitoniais, com ambos antígenos apresentados na superfície dos esporos, apresentaram níveis elevados de IgG específicos. Foi observado ainda que os níveis de anti-TTFC se apresentaram superiores aos de anti-LTB, entretanto ambos exibiram resultados significativamente diferentes dos grupos controles. Além das imunizações intraperitoniais, imunizações orais também foram feitas, onde os níveis de IgG anti-TTFC se mostraram superiores nos camundongos vacinados com esporos recombinantes (CotC-TTFC), apresentando resultado superior ao grupo vacinado com esporos não recombinantes. Já a resposta de IgG sérica anti-LTB, nos camundongos imunizados com esporos (CotC-LTB), não se mostrou significativamente acima da resposta obtida em camundongos imunizados com esporos não recombinantes.

Desta forma, o estudo concluiu que a presença dos antígenos na superfície dos esporos não afeta a estrutura dos mesmos, além disso constataram que ambos os antígenos mantiveram sua imunogenicidade quando apresentados na superfície dos esporos, induzindo elevados níveis de IgG no soro, significativamente diferentes dos camundongos controles (imunizados com esporos não recombinantes (MAURIELLO et al., 2004).

A metodologia de apresentação de antígenos por esporos recombinantes também foi testada para a Tuberculose, visto que, a atual vacina BCG, não é totalmente protetora contra tuberculose. DAS e colaboradores (2016) desenvolveram estudo, a fim de encontrar uma nova formulação de vacina para a doença. Uma alternativa foi a utilização de esporos de *Bacillus subtilis* para expressão de dois antígenos principais (Ag85B e o CPF10) imunodominantes de *Mycobacterium tuberculosis*. Os anticorpos IgG produzidos em camundongos imunizados por via intranasal, foram específicos para T85BCFP (fusão dos antígenos Ag85B e CPF10 expressos em *B. subtilis*), não havendo diferenças importantes nos níveis de IgG entre eles. Camundongos imunizados com BCG apresentaram níveis de anticorpos semelhantes aos imunizados com esporos recombinantes. Em conclusão, o estudo indicou que os esporos podem ser projetados como forma de administrar os antígenos de *M. tuberculosis* no sistema imunológico de mucosa, apresentando assim, uma nova via para desenvolvimento de vacinas eficazes contra tuberculose.

Esses dados demonstram o grande potencial dos esporos como apresentadores de antígenos heterólogos e indicando que este se mostra uma metodologia poderosa de *delivery* vacinal.

Os esporos de *B. subtilis*, vem sendo explorado durante anos, e seu amplo espectro de utilização biotecnológica tem chamado atenção dos pesquisadores, principalmente sua aplicação, devido às facilidades de transporte, e resistência, barateando a sua utilização. Muitos estudos já foram feitos utilizando o esporo como *delivery* vacinal para várias doenças, entretanto, não há bases de artigos e patentes, que relatem o uso de expressão e adsorção de antígenos de malária na superfície de esporos de *B. subtilis* (busca realizada pelo NIT-ILMD, FIOCRUZ em março de 2017), o que mostra o grande potencial deste estudo em obter novas ferramentas passível de proteção patentária e aplicação biotecnológica.

Dada a ampla gama de aplicação dos esporos de *B. subtilis* como *delivery* vacinal para inúmeras doenças, juntamente com o fato da proteína Pf-MSP1-19 se mostrar um dos mais promissores antígenos vacinais para malária, este trabalho teve como objetivo principal avaliar a resposta imune frente ao antígeno Pf-MSP1-19 de *Plasmodium falciparum*, presente na

superfície dos esporos. Este estudo faz parte de um projeto maior que tem como finalidade analisar a capacidade de antígenos vacinais de malária apresentados por esse sistema, de gerar anticorpos funcionais que poderão inibir a invasão *in vitro* de *Plamodium falciparum*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar resposta humoral estimulada por probiótico contendo a 'Proteína 1' de superfície de merozoíto (*Pf*-MSP1-19) de *Plasmodium falciparum*

2.2 Objetivos Específicos

- Padronizar método de isolamento, quantificação e funcionalização dos esporos de *Bacillus subtilis*;
- Confirmar expressão da *rPf*-MSP1-19 na superfície do esporo recombinante;
- Analisar melhor via de imunização em camundongos Balb/C para obtenção de antissoros anti-*rPf*-MSP1-19 acoplado a esporos de *B. subtilis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética de uso animal (CEUA), em anexo (Anexo 1), do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), com número de registro 053/2016.

3.2 Obtenção e separação dos esporos

Os esporos de *Bacillus subtilis* Wild Type e os esporos recombinantes, expressando a proteína MSP1-19 em sua superfície, foram obtidos de trabalhos anteriores em cooperação com a Università Degli Studi Di Napoli Federico II, onde a recombinação dos esporos de *Bacillus subtilis* com a rPf-MSP1-19 foi feita através de Duplo *Crossin over*.

A esporulação do *B. subtilis* Wild type e recombinante foi feita seguindo protocolo de Hinc et al. (2010), padronizado no laboratório do Dr. Ezio Ricca.

Os esporos foram obtidos através do método de exaustão de nutrientes em meio *Difco Sporulation*. A cultura foi acompanhada através de observação por microscopia em objetiva de 10x100, até que fosse observado uma maior quantidade de esporos e poucas células vegetativas. O meio de cultivo foi centrifugado a 2.500x g e o pellet foi lavado três vezes com água ultrapura gelada, em seguida a suspensão de esporos em água foi incubada à 4°C por 24h. Os esporos passaram por um processo de separação, para retirar as células vegetativas presentes, para isso a suspensão de esporos em água foi centrifugada e o pellet foi ressuscitado com 1mL de uma solução de Renografina (Gastrografin 370mg) à 20%, em um tubo Falcon de 15mL foram adicionados 5mL de uma solução de renografina à 50%, onde o pellet ressuscitado foi adicionado cuidadosamente observando-se a formação de duas fases, após isso o sistema foi centrifugado o sobrenadante descartado e o pellet formado ressuscitado novamente em renografina 20% e então repetiu-se o processo descrito anteriormente. O pellet foi então lavado 3 vezes com água ultrapura gelada, ressuscitado em água e armazenado à 20°C.

Os esporos foram autoclavados à 120°C por 45 minutos, após isso uma alíquota foi cultivada em placa contendo meio Luria Bertani ágar para confirmar a inexistência de células vegetativas na amostra.

3.3 Cultivo e indução da proteína rPf-MSP1-19

O plasmídeo Pf-MSP1-pRSET contendo o gene da rPfMSP1-19, foi obtido através de estudos anteriores realizados no laboratório do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), e produzido pela empresa IDT.

A expressão da rPf-MSP1-19 recombinante, utilizada nos ensaios de ELISA e para imunizações e acoplamento na superfície dos esporos de *Bacillus subtilis* Wild Type, foi feita em cepa de *Escherichia coli* BL21, o plasmídeo foi transformado por método de eletroporação e plaqueado em meio Luria Bertani ágar, acrescido de antibiótico ampicilina 50 µg/mL e clorofenicol 34 µg/mL, a placa foi incubada em estufa à 37°C por cerca de 16 horas. Após o crescimento, as colônias observadas foram inoculadas em pré-inóculos compostos por meio Luria Bertani (LB) líquido em tubos com volume de 3mL de meio, com os mesmos antibióticos utilizados anteriormente, e incubados em agitação em estufa com agitação por cerca de 16 horas à 37°C. Após isso o pré-inóculo foi adicionado ao meio LB líquido nas mesmas condições anteriormente discutidas, em um volume de 1L.

A cultura foi acompanhada por leitura em atingir absorvância de $A_{600}=0,6$ D.O, foi então adicionado o reagente indutor IPTG a uma concentração final de 1mM e incubado durante 3 horas em estufa com agitação à 37°C. O meio foi então centrifugado à 2.500x g, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em tampão de lise contendo, 20mM de Tris pH8.0, 500mM NaCl, 1mM de PMSF e glicerol 10%.

Em seguida, foram submetidas à lise celular por sonicação. O produto da sonicação foi centrifugado por 15 min a 20.817x g e o sobrenadante recuperado para ser submetido à purificação.

3.4 Purificação da proteína recombinante

A proteína foi purificada em Aktapurifier General Elector, por técnica de cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC), desenvolvida por Porath em 1975. Utilizou-se a coluna HisTrap HP de 1mL, contendo íons de Ni²⁺, com afinidade por cauda de Histidina.

As etapas de lavagens e eluição da proteína foram realizadas com tampão A correspondente ao mesmo tampão de lise anteriormente descrito no tópico 3.3, e o tampão B contendo Imidazol a 1M. As frações foram eluídas por gradiente de Imidazol e acompanhadas por *software* Unicorn 5.11.

Após purificadas as frações correspondentes à eluição da proteína foram submetidas à concentração em coluna Amicon® Ultra. Primeiramente foi adicionado 2 mL do purificado em coluna de 30KD, e centrifugado à 1.250x g em temperatura ambiente durante 30 min, após isso o volume que passou pelo filtro foi transferido para a coluna de 10KD, onde foi novamente centrifugado durante 40 min, o volume que passou foi armazenado para análise me gel, e a proteína já concentrada que ficou na coluna foi coletada também para análise em gel.

3.5 Análise da Purificação e concentração da proteína recombinante

Para análise da purificação da proteína rPf-MSP1-19, utilizou-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS-PAGE 15% (*running gel*) e 5% (*Stacking gel*), contendo solução de acrilamida/bisacrilamida 30%, Tris 1M pH 8,8, persulfato de amônia a 10%; dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e 5µL de Temed e água milliQ para um volume final de aproximadamente 5mL, seguindo protocolo de Maniatis et al., (1989).

Alíquotas da proteína concentrada e dos descartes das colunas de concentração, foram aplicadas no gel submerso em tampão de corrida (Tris 0,01M, pH6,8; SDS 10%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,06% e DTT a 4%) e em seguida desnaturadas por aquecimento à 95°C em banho-seco por 10 minutos. A eletroforese foi realizada à corrente elétrica constante de 100 Volts até que a marcação de azul alcance a extremidade inferior do gel.

Após a eletroforese, a proteína foi fixada em solução corante contendo azul de *coomassie* (*coomassie blue* 0,2%), ácido acético glacial 7%, etanol 40%, diluídos em água destilada. Uma vez corada foi submetida a descoloração utilizando os mesmos reagentes da coloração, exceto o *coomassie* para a visualização da banda correspondente à proteína.

3.6 Quantificação dos esporos purificados por Citometria de fluxo.

Após a separação dos esporos é necessário determinar a concentração dos mesmos para seguir com a metodologia de acoplamento. Para quantificação utiliza-se normalmente o espectrofotômetro, entretanto propomos uma quantificação utilizando o equipamento FACS cantu 2 e Beads BD TrucountTM.

As *Beads* foram ressuspensas em 50 µL de PBS 1X, e utilizou-se 10 µL de *Beads* para cada amostra, tendo um volume final de 50 µL. Cada amostra foi lida de modo que o resultado observado na leitura, (Figura 9), observa-se as *Beads* destacadas em rosa, e os esporos em preto. Tendo a quantidade de Beads por µL, foi possível aplicar o cálculo descrito abaixo, fornecido pelo fabricante BD TrucountTM Tubes, catálogo nº 340334, para saber a quantidade de esporos por µL.

Cálculo para contagem de esporos

$$\frac{A \text{ (Número de células)}}{B \text{ (Número de Beads)}} \times \frac{C \text{ (volume de Beads)}}{D \text{ (Volume)}}$$

3.7 Caracterização Do Esporo Recombinante

A caracterização para confirmação da presença da rPf-MSP1-19 na superfície dos esporos de *B. subtilis* que foram recombinados, foi feita por técnica de *Immunoblot* (Towbin et al., 1979). Para isso, os esporos recombinantes foram submetidos à separação por eletroforese

em SDS-PAGE 15% e transferidas por eletroforese para uma membrana de nitrocelulose, embebido em tampão 0,025 M Tris, 0,192 M de glicina, pH 8,5 e metanol 20%.

O sistema foi alocado em uma cuba específica para eletrotransferência (*Semi-dry system*, Bio-rad, Hercules, USA). O sistema foi submetido à uma voltagem constante de 10 V durante 10 minutos. Após ser retirado da cuba a membrana foi armazenada em PBS 1X à 4°C até o momento da revelação.

Posteriormente foi realizada a revelação onde primeiramente a membrana foi bloqueada por 30 minutos utilizando 10 mL de solução de PBS 1X com BSA 3%, após isso a membrana foi lavada com 20 mL de água MiliQ durante 5 minutos e então foi adicionado o anticorpo Anti-MSP1-19 purificado, obtido em trabalhos anteriores, diluído na concentração de 1:100, durante 1h, a membrana foi então lavada 3 vezes, durante 5 minutos cada, com solução PBS 1X adicionado de Tween 20 à 0,05%. Foi adicionado o anticorpo secundário anti-*mouse* biotilado diluído 1:2000 e incubado durante 1 hora, a membrana foi então lavada novamente como descrito anteriormente e adicionado a estreptavidina KPL também na diluído 1:200, a membrana foi incubada durante 1 hora, lavada novamente e então revelada.

A revelação foi feita com 250 µL de Diaminobenzidina (DAB) e 2,5 µL de peróxido de hidrogênio, diluídos em um volume final de 5 mL de PBS 1X, até que as bandas fossem passíveis de visualização, a membrana então foi lavada com água e seca.

3.8 Adsorção do antígeno na superfície dos esporos

A adsorção da proteína recombinante à superfície do esporo foi feita por ligação covalente utilizando metodologia proposta por Falahati-Pour et al. (2015). Uma suspensão à 1×10^3 de esporos foi centrifugada, o sobrenadante descartado e o pellet de esporos ressuspendido com 250 µL de EDC durante 15 minutos a uma temperatura ambiente, então foi adicionado 250 µL de NHS a suspensão foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos, os esporos foram então centrifugados e o EDC e NHS removidos. Com os esporos preparados para ligação covalente, foi adicionada a proteína recombinante numa concentração final de 25µg e a suspensão incubada *over-night* sob agitação em temperatura ambiente, os esporos foram então lavados 3 vezes com PBS 1X e ressuspendidos em 600µL da mesma solução.

3.9 Imunização Dos Camundongos Com As Ferramentas Produzidas

Grupos de camundongos, contendo 5 animais cada, foram imunizados, via oral e intraperitoneal.

3.9.1 Imunizações Orais

As imunizações foram feitas seguindo protocolo de imunização de Del Rio et Al., (2008), entretanto estes utilizaram *Lactobacillus plantarum*, enquanto neste trabalho utilizou-se *Bacillus subtilis* vegetativa e esporos. Para isso os seguintes grupos foram delineados

Grupo 1: Imunização com a proteína rPf-MSP1-19 em PBS 1X;

Grupo 2: Imunização com esporos de *B. subtilis* vegetativa *Wild Type*;

Grupo 3: Imunização com *B. subtilis* vegetativa recombinante, expressando a rPf-MSP1-19 na superfície dos esporos.

Grupo 4: rPf-MSP1-19 adsorvida covalentemente na superfície dos esporos *WT*;

Os camundongos foram imunizados oralmente com o auxílio de uma agulha de gavagem, foram inoculados uma quantidade de 1×10^8 de *B. subtilis* vegetativa recombinante e *WT*, 1×10^3 de esporos acoplados com o antígeno, 5µg de rPf-MSP1-19 por camundongo. O regime de imunização se fez da seguinte forma: durante 8 dias os camundongos foram imunizados duas vezes ao dia (nos dias 1 a 4 e 8 a 11), após 2 semanas foram coletadas amostras de sangue, para isso os camundongos foram anestesiados com 90 mg/Kg de Quetamina e 82 mg/Kg de Xilasina, e então foi feita a coleta via retro-orbital. Nos dias 30 a 33 os camundongos receberam o primeiro *booster* oral. No dia 45 foi feita a segunda coleta de sangue e nos dias 52 a 55 receberam o segundo *booster* oral. No dia 64 foi realizada a terceira coleta de sangue dos camundongos, e após um mês da última coleta, foi realizada uma nova sangria.

Os controles negativos foram obtidos a partir de coleta de sangue de camundongos não inoculados com qualquer substância, tempo 0;

As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas à $6.795 \times g$ durante 10 minutos, o soro foi coletado e armazenado à -20°C para realização dos ensaios de ELISA.

3.9.2 Imunizações intraperitoneais

As imunizações intraperitoneais foram feitas seguindo protocolo de Mauriello et al. (2004), para as imunizações foram delimitados os seguintes grupos:

Grupo 1: rPf-MSP1-19 juntamente com adjuvante de Freund;

Grupo 2: esporos de *B. subtilis* *WT* com rPf-MSP1-19 acoplada à sua superfície;

Grupo 3: esporos de *B. subtilis* recombinante;

Grupo 4: esporos de *B. subtilis* *WT*;

Grupo 5: bactéria *B. subtilis* recombinante;

Grupo 6: bactéria *B. subtilis* *WT*;

Grupo 7: *rPf*-MSP1-19 em PBS 1X.

As imunizações foram feitas via intraperitoneal utilizando seringa de 1mL, foram inoculados 1×10^8 das bactérias *B. subtilis* recombinante e acoplado; 1×10^3 de esporos acoplados, recombinante e WT e uma concentração final por camundongo de 5 μ g de *rPf*-MSP1-19 em PBS e Com adjuvante de Freund.

O regime foi quinzenal, onde no dia 1 foi feita a primeira imunização, no dia 15 foi realizada a primeira coleta de sangue, como descrito anteriormente, e realizada a 2ª imunização. No dia 30, foi realizada a segunda coleta de sangue e a 3ª imunização. No dia 45 a 3ª coleta de sangue foi realizada e a 4ª e última imunização. No dia 60 a 4ª coleta de sangue foi feita.

Os controles negativos foram obtidos a partir de coleta de sangue de camundongos não inoculados com qualquer substância, tempo 0;

As amostras de sangue foram centrifugadas, o soro separado e armazenado como descrito anteriormente.

3.10 ELISA Indireto

As reações de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), descrito por Harlow & Lane (1988), foram realizadas afim de avaliar a presença de anticorpos contra *rPf*-MSP1-19 nos soros dos camundongos imunizados. Todas as amostras de soros foram testadas em duplicatas.

Em resumo, os poços de uma placa de 96 poços foram sensibilizados com 2 μ g de *rPf*-MSP1-19 recombinante, diluída em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 e deixado *overnight* a 4°C. No dia seguinte os poços foram lavados 3 vezes com PBS Tween 0,05% e bloqueados com PBS 1x e BSA 3% adicionando-se 200 μ L por poço e incubados a 37°C por 2 horas. Todos os soros foram diluídos 1/100 no mesmo tampão de bloqueio, foram então adicionados 50 μ L em cada poço e incubados em câmara úmida em estufa a 37°C, por 1 h e em seguida lavados 5 vezes com PBS 1X Tween 0,05%. Anticorpo anti IgG-Mouse biotilado KPL foi diluído 1:2000 no mesmo tampão de bloqueio, e adicionado 50 μ L aos poços em seguida incubados a 37°C em câmara úmida por 1 h e em seguida lavados novamente 3 vezes com PBS Tween 0,05% descrito. Foi adicionado aos poços 50 μ L de estreptavidina KPL diluída 1/2000 em tampão de bloqueio e incubado nas mesmas condições por 1h, os poços foram lavados como já descrito. Em seguida o substrato cromogênico, composto por Tetrametilbenzidina 1M (TMB - Sigma) e H₂O₂ (água oxigenada) foram adicionados em cada cavidade da placa (50 μ l) por 10 minutos para revelação da reação que, em seguida, foi interrompida com 50 μ l H₂SO₄ a 2M. A

densidade óptica (D.O) foi determinada por uma leitora de ELISA (Thermo®) utilizando filtro de 450nm em leitor de ELISA.

O “cut-off” foi calculado pela média das D.O. de 5 amostras de soros negativos, em duplicatas, mais duas vezes o desvio padrão. Para determinar se as amostras eram positivas para a proteína *rPf*-MSP1-19. Como controle positivo foram utilizados anticorpos anti-*rPf*-MSP1-19 purificados, obtidos de trabalhos anteriores onde camundongos foram imunizados via intraperitoneal com *rPf*-MSP1-19 juntamente com adjuvante de freund.

3.11 Análises de dados estatísticos

Os resultados obtidos no presente estudo foram analisados utilizando os programas estatísticos PRISMA versão 5.0 aplicado teste T ANOVA com P value menor que 0,05.

Foi avaliado teste não paramétrico que compara um grupo em relação a outros. Para verificar se existe diferença significativa dos nossos resultados em relação aos outros grupos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção dos esporos

A bactéria foi inoculada em meio DS (*Difco Sporulation*), como descrito anteriormente na metodologia, até a exaustão de nutrientes para que houvesse a esporulação da bactéria. Como pode ser visto nas Figura 7 A e B.

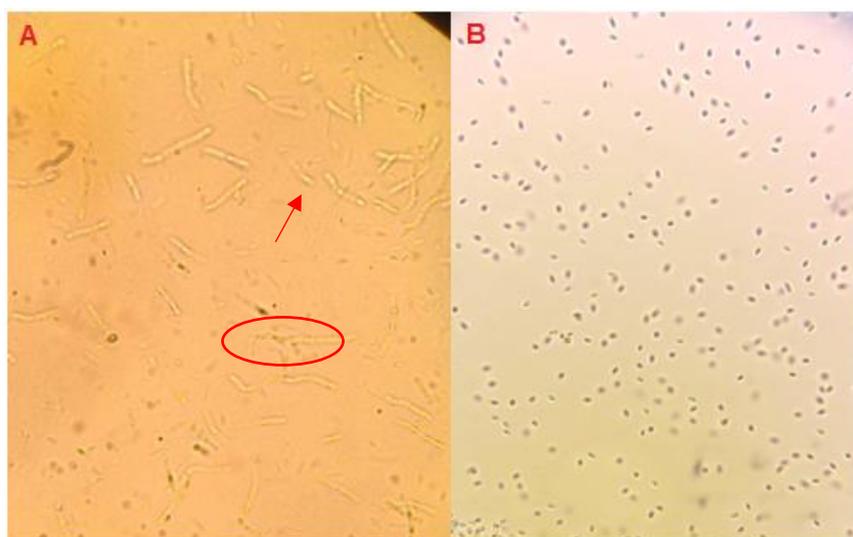


Figura 7. Esporulação da *Bacillus subtilis* observadas por microscopia em objetiva 10x100. (A) Células vegetativas; (B) Esporos separados utilizando Renografina.

Fonte: própria (2017).

Foi possível observar a presença das células vegetativas de *Bacillus subtilis*, algumas se apresentaram em processo de esporulação (Figura 8 A em destaque), sendo possível identificar o endoesporo sendo formado pela bactéria (apontado pela seta em vermelho), este estado foi observado após 24 horas de cultivo. Na Figura 8 B, encontra-se apenas os esporos, estes já separados das células vegetativas de *B. subtilis*, por gradiente de renografina, confirmando a alta eficiência da técnica descrita por HINC et al. (2010).

Foi também observado que para melhorar separação dos esporos seria necessário que o pellet, oriundo da centrifugação da suspensão de *B. subtilis* em água, fosse ressuspensionado em mais de 1mL de renografina 20%, pois quando ressuspensionado neste volume há uma grande concentração de massa bacteriana, impedindo com que os esporos atravessassem a malha da renografina a 50%, desta forma observa-se uma concentração de esporos muito pequeno após a centrifugação. Para otimizar a quantidade de esporos obtidos na separação, foi necessário ressuspender o pellet em 2 mL de renografina 20%, e centrifugar separadamente (1mL por vez), desta forma a obtenção dos esporos puros foi maior que a metodologia padrão.

Após a separação por renografia foi necessário que os esporos fossem autoclavados para que houvesse a inativação de qualquer protease presente na amostra ou a existência de alguma célula vegetativa. Desta forma, a autoclavagem dos esporos foi testada em 15, 30 e 45 minutos, seguida de cultivo de uma alíquota da amostra em meio de cultura com agar. Apenas após 45 minutos de autoclavagem, não observou-se mais a presença de células vegetativas em cultura, tornando-se assim este o padrão de tempo como utilizado para a inativação dos esporos.

4.2 Padronização da quantificação por Citometria de Fluxo

A quantificação do *B. subtilis* foi realizada utilizando citometria de fluxo (Figura 9), sendo possível observar na imagem a população correspondente aos esporos não autoclavados, demarcado em preto de acordo com metodologia descrita no tópico 4.4, onde obtivemos uma quantificação de 5.904 células/ μL para a amostra de esporos purificada.

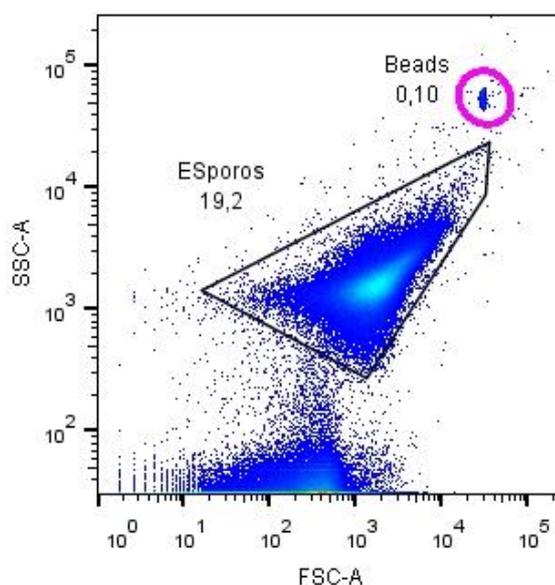


Figura 8. Gráfico de leitura de esporos utilizando *Trucount Beads*. Gráfico construído em Software *FlowJo*

Vale ressaltar que não há relatos na literatura acadêmica utilizando citometria de fluxo e *Trucount beads* para quantificação de esporos. Em nossa revisão bibliográfica foi encontrado apenas uma patente de identificação US20040023319A1 que determina um método de quantificação de esporos empregando citometria de fluxo para esporos, visto que a quantificação por espectrofotômetro, técnica clássica mais utilizada para quantificação de esporos, é pouco exata. Logo, propomos a utilização desta metodologia afim de obter uma melhor acurácia do método de quantificação de *B. subtilis*.

4.3 Padronização do Acoplamento

Antes de efetivamente realizar o acoplamento dos esporos obtidos com a proteína rPf-MSP1-19, foi realizado um teste afim de padronizar o protocolo de acoplamento dos esporos e antígeno, por meio de adsorção física, de acordo com a metodologia descrita por Hinc e colaboradores (2010) (padronizado no laboratório do Dr. Ezio Ricca), utilizando esporos separados por renografina e não autoclavados. Neste, os esporos seriam incubados junto à proteína em tampão PBS pH4,0. Para a padronização utilizamos a proteína estreptavidina fluorescente 0,5 mg/mL da marca BD Biosciences (Cat: 554061). Após o acoplamento as amostras foram analisadas em citometria de fluxo e lidas no canal FL2 (PE) utilizada para leitura de fluorescência de estreptavidina, para observar se houve acoplamento, através da emissão de fluorescência. O resultado analisado por meio do software FlowJo, pode ser observado na Figura 10.

No controle negativo (sem estreptavidina marcada), como pode ser observado na Figura 9 A, é possível notar em destaque a presença dos esporos (demarcado em rosa), sendo possível observar ainda que os esporos se apresentam em três regiões diferentes no gráfico. Acreditamos que isto se deve a interação entre os esporos, o que formariam estruturas mais complexas, ou a existência de células vegetativas na amostra tratada. Na análise de fluorescência (Figura 9 B), do controle negativo, como já era esperado não houve emissão de fluorescência, visto que a estreptavidina não estava presente na amostra, apenas esporos.

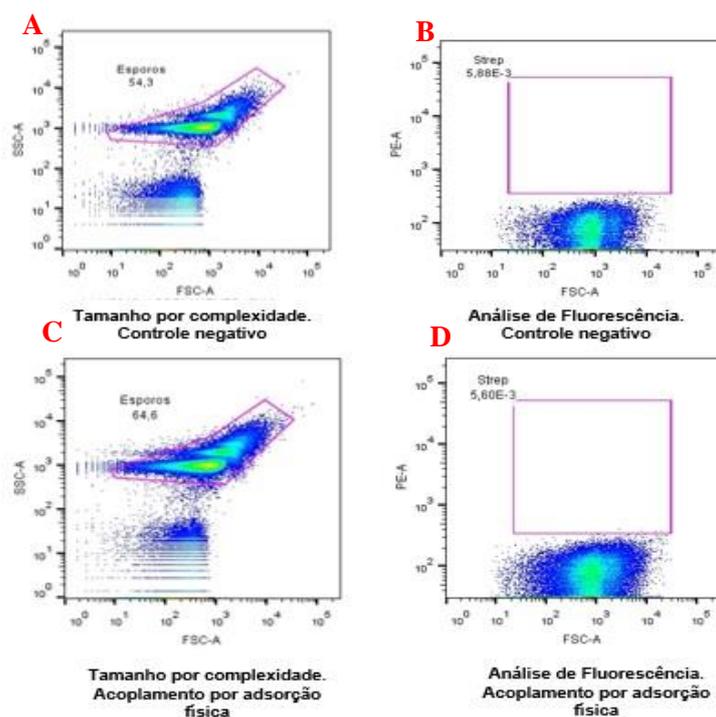


Figura 10. Análise, em *software* FlowJo, do acoplamento da proteína estreptavidina na superfície dos esporos, por adsorção física. A) análise de tamanho por complexidade para confirmação da presença de esporos do controle negativo; B) verificação da emissão de fluorescência do controle negativo; C) tamanho por complexidade do acoplamento por adsorção física, para confirmação da presença de esporos; D) análise de fluorescência do acoplamento por adsorção física com estreptavidina.

Para a amostra contendo a estreptavidina, é possível observar na análise de tamanho por complexidade (Figura 10 C) o mesmo padrão de tamanho e complexidade. Na análise de fluorescência, do acoplamento por adsorção física (Figura 10 D), não foi observada emissão de fluorescência, indicado na área demarcada em rosa, assim como no controle negativo, demonstrando assim que não houve o acoplamento da proteína junto a superfície dos esporos. Não foi possível entender o motivo de não ter ocorrido acoplamento, visto que a metodologia empregada é amplamente usada para fins de ancoragem entre esporos de *B. subtilis* e antígenos, porém acreditamos que a provável presença de células vegetativas pode ter influenciado neste resultado. Logo, visto que após diversos testes não houve sucesso no acoplamento por meio desta metodologia, esta foi alterada para a descrita por FALAHATI-POUR e colaboradores (2015), onde foi realizada a adsorção da proteína à superfície dos esporos por meio de ligação covalente com os reagentes N-hydroxysuccinimide (EDC) e N-Hydroxysuccinimide (NHS).

Logo, aplicou-se a metodologia de acoplamento por ligação covalente, utilizando os esporos autoclavados (buscando inibir qualquer ação de proteases presente na amostra ou que

haja o surgimento de células vegetativas de *B. subtilis*). Na figura 10 A e B, é possível observar que a quantidade de esporos foi reduzida quando comparado com a figura 11A. Isto ocorreu ao processo de autoclavagem levar a redução do número de células viáveis. Como esperado e observado na figura 10 B, não houve emissão de fluorescência, dado a ausência da estreptavidina marca.

Na figura 11 C e D, podemos observar o acoplamento da estreptavidina junto aos esporos autoclavados. Na imagem 11 C, observa-se o gráfico de tamanho por complexidade, onde os esporos novamente se apresentam na mesma região do gráfico, demarcado em rosa. Na imagem 10 D, pode-se observar que houve fluorescência na população da proteína utilizada, área demarcada em rosa, demonstrando que houve a adsorção da estreptavidina na superfície dos esporos, sendo que 20% dos esporos se encontram acoplados à estreptavidina, mostrando o sucesso da metodologia. Sendo assim, esta foi a metodologia utilizada para adsorver a proteína *rPf-MSP1-19* na superfície dos esporos e seguindo então para a imunizações em camundongos.

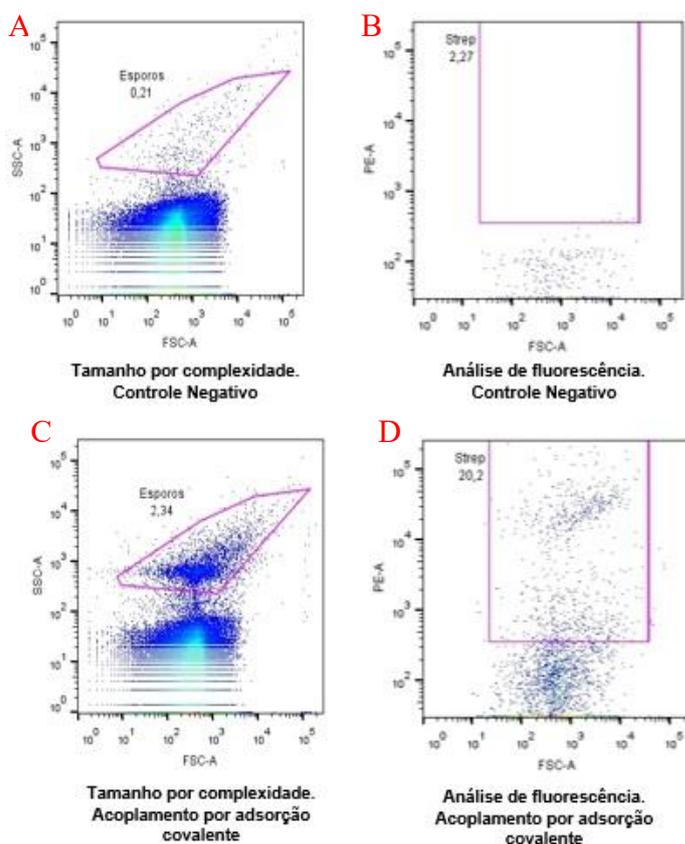


Figura 11. Análise, por *software* FlowJo, do acoplamento por adsorção covalente da proteína estreptavidina na superfície de esporos. A) gráfico de tamanho por complexidade do controle negativo; B) análise de fluorescência do controle negativo; C) gráfico de tamanho por complexidade do acoplamento covalente da proteína

estreptavidina na superfície de esporos de *B. subtilis*; D) Análise de fluorescência do acoplamento covalente entre a proteína e os esporos.

4.4 Cromatografia por afinidade e SDS-PAGE da rPf-MSP1-19.

A purificação da rPf-MSP1-19 foi realizada com sucesso por cromatografia de afinidade em coluna de níquel, de acordo com metodologia descrita anteriormente. É possível observar na figura 10, a eluição da proteína recombinante na porção solúvel do lisado bacteriano (o pico da linha C entre as frações 7 e 9).

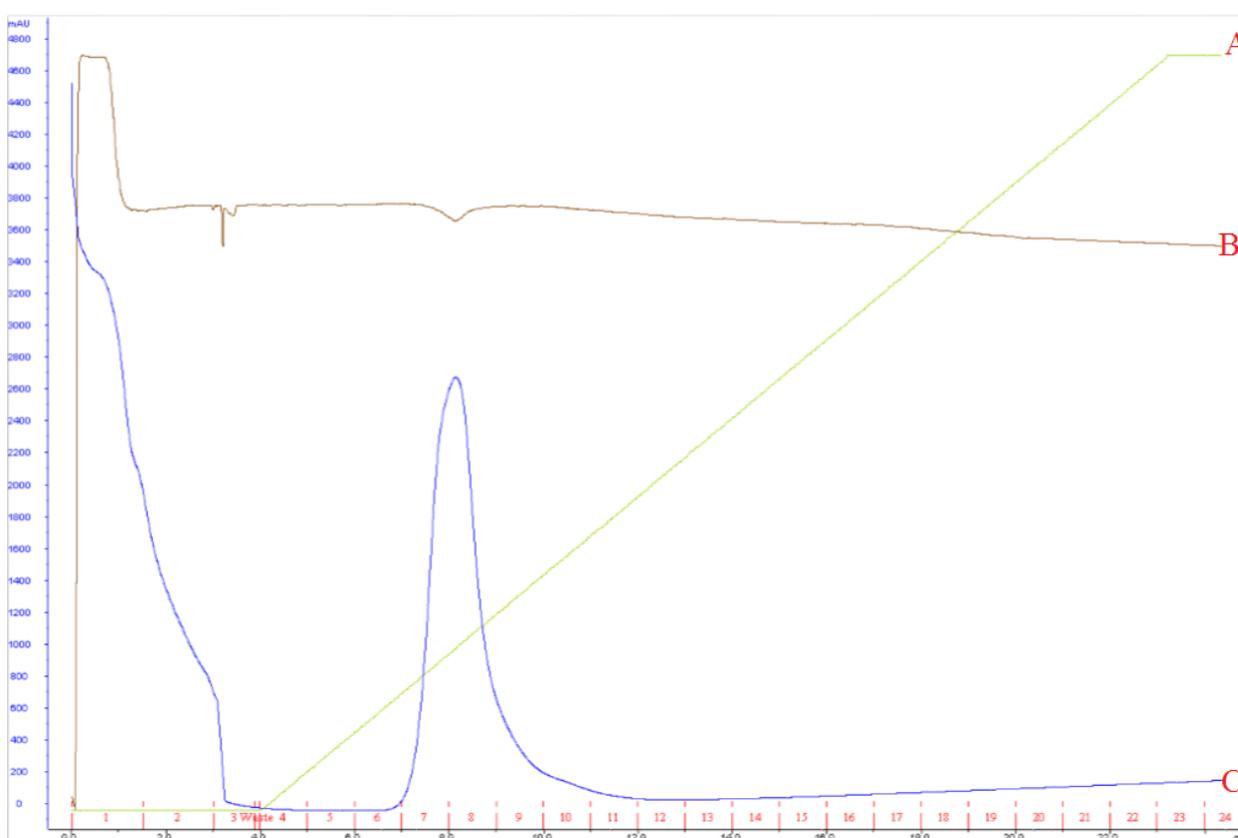


Figura 12: Gráfico de cromatografia por afinidade em Aktapurifier General Elector em coluna HisTrapHP. A: Linha correspondente a condutividade; B: Linha correspondente à ao tampão de eluição com Imidazol e C: linha correspondente a afinidade da proteína.

em colunas de Amicon®Ultra 10KD e 30KD e analisadas em gel SDS-PAGE 15% (Figura 11). Pode-se observar na canaleta de número 2 a banda correspondente à rPf-MSP1-19 recombinante, apresentando tamanho esperado de ~ 25kDa, quando comparado ao *ladder*, não sendo possível observar a presença de outras bandas de proteína.

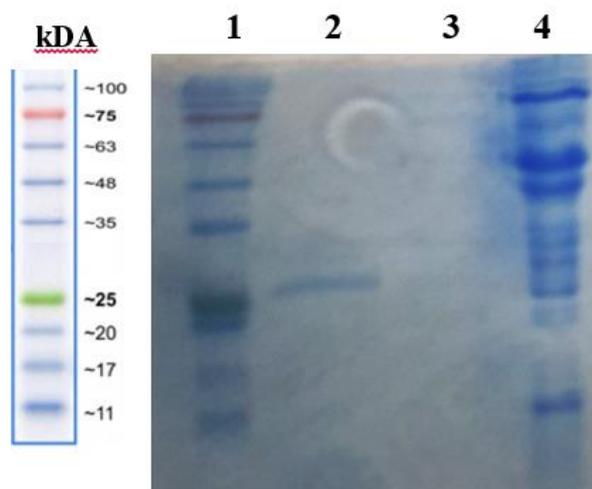


Figura 13. Gel de SDS-PAGE à 15% referente à concentração da proteína *rPf*-MSP1-19 em coluna Amicon® Ultra. Poço 1: *ladder* de proteína *BLUeye Prestained Sigma-Aldrich*. Poço 2: Proteína *rPf*-MSP1-19. Poço 3: descarte da coluna de 10kD. Poço 4: descarte da coluna de 30kD.

Desta forma a proteína *rPf*-MSP1-19 foi separada e concentrada, obtendo ao fim uma única amostra de 0,7 μ g/ μ L. Esta foi então utilizada para os demais ensaios: acoplamento com os esporos de *Bacillus subtilis Wild Type*, imunizações em camundongos e ensaios de ELISA indireto.

4.5 Caracterização das ferramentas produzidas

Utilizando anticorpo anti- *rPf*-MSP1-19 purificado obtido em trabalhos anteriores, foi realizado um *Western-blot* afim de viabilizar as ferramentas a serem utilizadas nas imunizações (figura 12). Observa-se uma banda de ~25kDa correspondente à proteína *rPf*-MSP1-19 (canaleta 2 indicado na seta preta pontilhada), e na canaleta 3 observa-se a detecção de três bandas. Isto se deve ao processo de clivagem que esta proteína sofre durante seu processamento no *Plasmodium falciparum* (Holder, 2009).

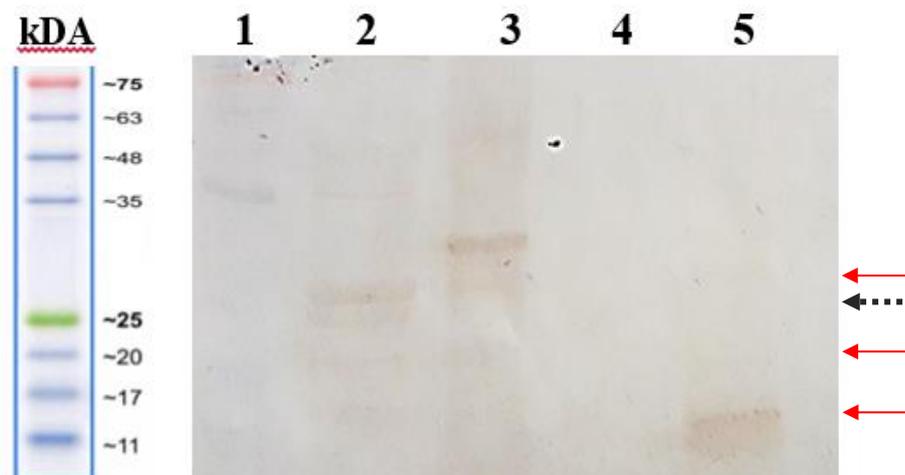


Figura14. *Western-blot* das ferramentas utilizadas onde a canaleta marcada enumerada 1 corresponde ao *ladder* *BLUeye prestained Sigma-Aldrich*; canaleta 2: *rPf-MSP1-19* recombinante; canaleta 3: extrato de *Plasmodium falciparum*; canaleta 4: esporo de *B. subtilis* *Wild Type* (WT); canaleta 5: Esporo de *B. subtilis* recombinante.

Não foram detectadas bandas nos esporos *Wild Type* autoclavados (canaleta 4), resultado esperado visto que se tratava de um controle negativo, não possuindo a proteína *rPf-MSP1-19*. Na canaleta 5, correspondente aos esporos de *Bacillus subtilis* recombinante autoclavados, pode ser observado a detecção de três bandas (apontadas pelas setas em vermelho): uma de ~30kDa, banda de massa esperada porem de difícil visualização; uma de aproximadamente 20kDa; e a última mais forte de ~11kDa, acredita-se que estas últimas bandas correspondem a uma degradação da proteína *rPf-MSP1-19* por proteases produzidas pelas células vegetativas antes de autoclavadas. Logo, a proteína *rPf-MSP1-19* encontrada no esporo recombinante é fragmentada em diferentes tamanhos, provavelmente devido ao reconhecimento de proteases da bactéria durante seu processo de formação.

4.6 Ensaio de imunização oral

Ensaio *in vivo* foram realizados para verificar se os esporos juntamente com a proteína *rPf-MSP1-19* induziriam uma resposta imune específica. Camundongos BALB/c foram imunizados via oral seguindo regime constante como descrito no método: o grupo *rPf-MSP1-19* recebeu apenas a proteína purificada (sem adjuvante); o grupo *Bacillus subtilis* recombinante foi inoculado com a bactéria vegetativa recombinante; outro grupo foi imunizado com os esporos *Wild Type* autoclavados acoplados à *rPf-MSP1-19* purificada; e o grupo WT foi imunizado apenas com esporos *Wild Type* autoclavados, sendo este o controle negativo. Nossos resultados demonstraram que o grupo *rPf-MSP1-19* recombinante e acoplado não induziram

uma resposta de forma satisfatória pela via oral, quando comparados ao grupo controle WT que apresentou uma elevada reatividade (figura 13), sendo assim, não foi possível afirmar que houve a correta entrega do antígeno ao sistema imune dos camundongos.

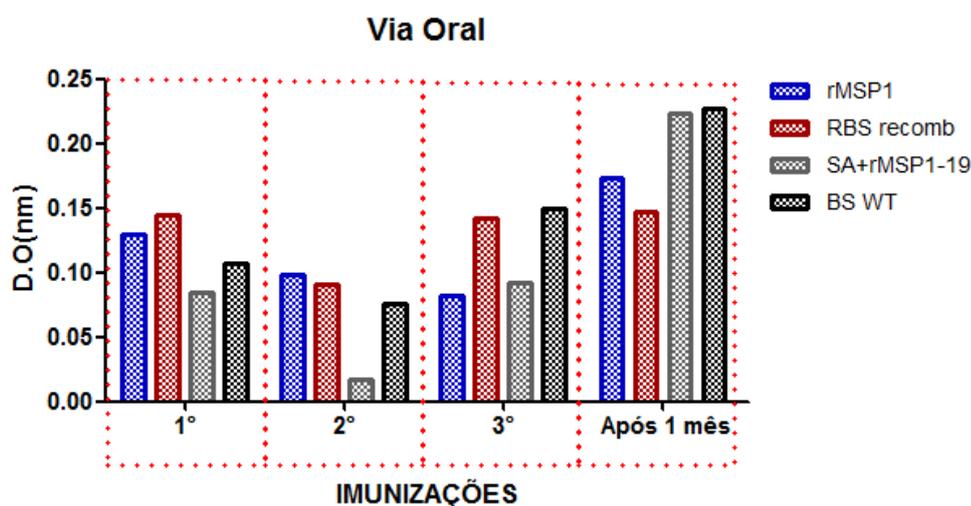


Figura 15. Reatividade dos soros de camundongos imunizados com a bactéria *Bacillus subtilis* recombinante (vermelho), com o esporo acoplado à *rPf-MSP1-19* (cinza escuro) e controles *rPf-MSP1-19* (azul) e esporos *Wild Type* (preto), frente ao antígeno *rPf-MSP1-19*. Eixo horizontal correspondente às imunizações e coleta após 1 mês e eixo vertical correspondente a Densidade ótica (D.O).

Um estudo de Zhou et al., (2015) utilizou a proteína Urease B de *Helicobacter pylori* expressa na superfície dos esporos através da fusão com a proteína de superfície CotC e observou que os camundongos imunizados oralmente foram capazes de produzir anticorpos IgA fecal e IgG sérico específicos para o antígeno utilizado e quando desafiados observou-se que houve uma redução da carga bacteriana em 84%. Em nosso trabalho, contudo, não houve resposta de anticorpo específica contra a proteína *rPf-MSP1-19* no grupo imunizado com a bactéria recombinante (barra em vermelho). Diferentemente de nosso estudo, os camundongos de Zhou et al. (2015) foram imunizados com o *B. subtilis* em forma de esporos recombinantes, enquanto que em nossa pesquisa foi utilizada a forma vegetativa da bactéria recombinante. Logo, acredita-se que a bactéria não foi capaz de chegar ao intestino, podendo não ter suportado a degradação por enzimas e o pH extremamente ácido contido no estômago, de forma que o antígeno não foi apresentado ao sistema imune dos camundongos. Sendo assim, não houve a possibilidade de produção de anticorpos específicos para *rPf-MSP1-19* ou ainda que houve a degradação do antígeno por proteases produzidas pela própria bactéria, impedindo o reconhecimento do mesmo.

O grupo imunizado com os esporos autoclavados acoplados com *rPf*-MSP1-19 (representado pela barra em cinza), também não foi capaz de produzir resposta de IgG específica, mesmo de acordo com Sirec et al., (2012) que afirma que proteínas apresentadas por adsorção aos esporos demonstram estabilidade e são protegidas pela interação com o próprio esporo sendo mais estáveis do que as proteínas livres em altas temperaturas e condições de pH ácidos. Como esta proteína ainda não havia sido testada via oral, e ainda levando em consideração que cada antígeno se comporta de uma forma diferente em relação às interações e condições de imunização, há a possibilidade de que nos esporos acoplados com *rPf*-MSP1-19 tenha ocorrido a degradação da proteína por enzimas contidas no estômago ou pelo próprio pH ácido do estômago do camundongo. Além disso, a quantidade de esporos inoculados nos camundongos pode não ter sido o suficiente para despertar uma resposta imune suficiente contra o antígeno apresentado.

O grupo controle imunizado apenas com *rPf*-MSP1-19 não demonstrou resposta, como esperado, pois a *rPf*-MSP1-19 livre, sem a presença de algum adjuvante, é facilmente degradada em condições não favoráveis, com grande quantidade de proteases, por exemplo. O controle negativo contendo apenas esporos WT também não apresentou resposta contra a proteína *rPf*-MSP1-19, pois não havia presença do antígeno. Desta forma ambos os controles responderam como previsto.

Sendo assim, visto que as imunizações orais não apresentaram resultado satisfatório, definiu-se uma nova via de imunização afim de obter anticorpos anti- *rPf*-MSP1-19.

4.7 Ensaio de imunizações intraperitoneais

Camundongos BALB/c, foram imunizados por via intraperitoneais seguindo esquema de grupos descrito no tópico 3.9.2.

Os resultados dos ELISAs realizados, após as 4 imunizações podem ser observados na Figura 15. O resultado da resposta de IgG sérico específico para o esporo WT + *rPf*-MSP1-19 (barra vermelha) foi crescente até a 3ª dose sendo semelhante ao controle positivo *rPf*-MSP1-19 + Freund (barra de cor azul) com um pequeno decréscimo, após a 4ª imunização. Os controles negativos que consistem no esporo WT (barra cinza), *rPf*-MSP1-19 (barra amarela), *Bacillus subtilis* WT (barra verde) e *Bacillus subtilis* recombinante (barra cinza escuro) não foram capazes de induzir resposta em relação ao antígeno testado, como esperado, apresentando diferença estatística em relação ao grupo imunizado com *rPf*-MSP1-19 + Adj. Freund e SA+ *rPf*-MSP1-19, como constatado no gráfico da figura abaixo.

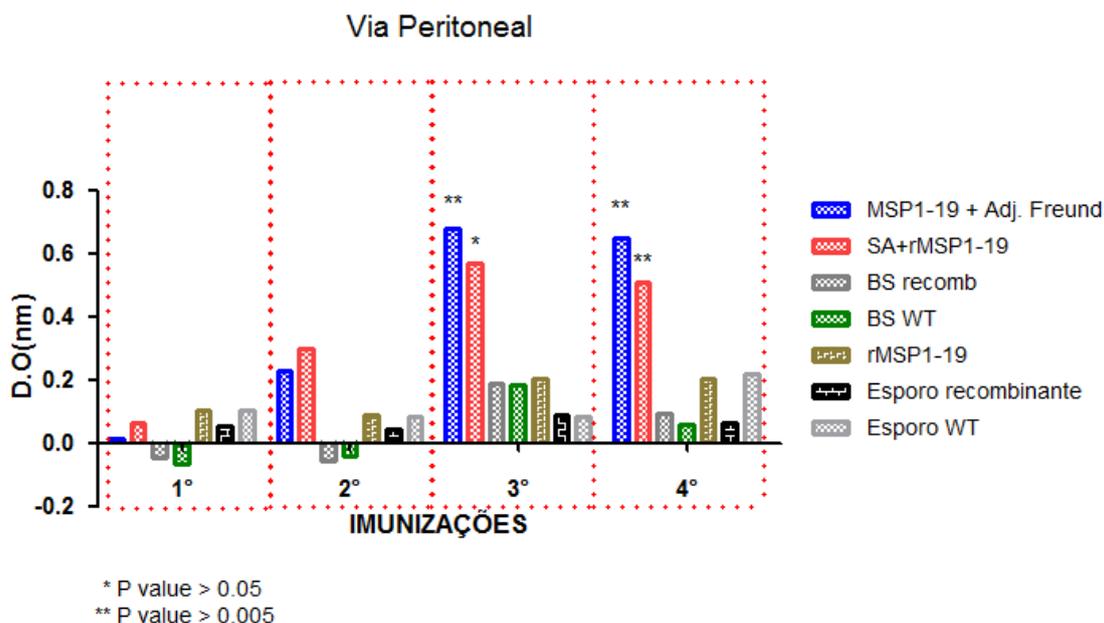


Figura16. Reatividade dos soros de camundongos imunizados por via intraperitoneal com a bactéria *Bacillus subtilis* recombinante (cinza escuro), espora acoplado à *rPf-MSP1-19* (vermelho), espora recombinante (preto) e controles, *rPf-MSP1-19* (amarelo), *B. subtilis* Wild Type (WT) (verde), esporos WT (cinza claro) e *rPf-MSP1-19* + adj. Freund (azul), frente ao antígeno *rPf-MSP1-19*. Eixo horizontal correspondente às imunizações e eixo vertical correspondente à D.O.

Quando observado o grupo imunizado com Esporos recombinantes autoclavados (barra preta), não notou-se uma reatividade significativa. Wu et al., (2017), imunizou camundongos com esporos recombinantes expressando a proteína CsCP de *Clonorchis sinensis*, por via intraperitoneal, e observaram que além de produzirem altos níveis de IgG específicos para CsCP, os camundongos imunizados com os esporos recombinantes alcançaram uma melhor proteção contra infecção por *C. sinensis* ao abrandar o processo de fibrose. Logo, acreditamos que a degradação da proteína *rPf-MSP1-19* na superfície dos esporos foi fato determinante para a não estimulação dos camundongos para produzirem anticorpos contra a proteína alvo. Na Figura 12, pode-se observar no *western-blot* bandas mais baixas, correspondentes à possível degradação da proteína.

O controle positivo, *rPf-MSP1-19* + adj. de Freund (barra azul), induziu a maior resposta, entretanto quando analisamos a resposta frente ao espora WT+ *rPf-MSP1-19* (barra vermelha), observa-se que não houve diferença estatística entre ambas, sendo assim, podemos afirmar que os esporos autoclavados de *B. subtilis* poderiam vir a ser um substituto ao adjuvante de Freund.

O Adjuvante de Freund é um composto a base de parafina monooleatodimanida e contém o *Mycobacterium tuberculosis* inativado muito utilizado para experimentos em animais (Uhlmann & Vollmer, 2003). Embora, este seja capaz de induzir uma resposta imune robusta ao desencadear um processo de inflamatório, sua utilização é questionável do ponto de vista humano, visto que o mesmo é responsável por causar dor visível aos camundongos com ele imunizados, e até fraqueza. Sendo assim, algumas instituições de cuidado com animais e Comitê de ética de uso animal proibem completamente o uso do adjuvante de Freund em imunizações feitas em camundongos (Kamala, 2007). Devido a isso, torna-se importante que haja o desenvolvimento de novas abordagens de adjuvantes que causem menos sofrimento e estresse nos animais e que sejam capazes de induzir uma boa resposta junto ao antígeno utilizado.

Não foi encontrado na literatura, estudos que utilizaram esporos de *B. subtilis* acoplados física ou quimicamente à antígenos com a finalidade de imunizar camundongos via intraperitoneais, apenas para imunizações por via nasal, oral e sublingual. Desta forma, como demonstrado em nosso estudo, estes se mostram sendo uma boa ferramenta para utilização como *delivery* vacinal e adjuvante. Além disso, devido à *Bacillus subtilis* possuir o status GRAS, esta pode vir a ser utilizada para imunizações em humanos, visto que há uma constante busca por novas abordagens de adjuvantes que possam ser aplicados à vacinação humana. Contudo testes de acoplamento com outros antígenos devem ser realizadas para comprovar o grau de aplicabilidade desta técnica.

Um levantamento sobre as aplicações de esporos de *B. subtilis* encontra-se em forma de revisão no anexo 2 já aceito para publicação na revista Scientia Amazonia.

5. CONCLUSÃO

O acoplamento químico utilizando EDC e NHS se mostrou o melhor método para o acoplamento da proteína *rPf*-MSP1-19 à superfície de esporos, em nosso laboratório, além disso a metodologia para quantificação de esporos utilizando Citometria de Fluxo e Beads BD Trucount™ demonstrou grande potencial, podendo ser utilizada como alternativa à quantificação por espectrofotometria após testes de comparação com outras metodologias.

Observou-se que houve a degradação da proteína *rPf*-MSP1-19 quando expressa diretamente na superfície do esporo, pelo método recombinante, podendo ser consequência da atividade de proteases da bactéria em sua forma vegetativa ou proteases dos esporos.

As imunizações orais, utilizando regime de imunização descrito, não foi capaz de induzir resposta imune frente aos esporos acoplados com *rPf*-MSP1-19, ou por ter sido inoculado quantidade insuficiente, ou por degradação da proteína no estômago do camundongo. Também não foi observado resposta contra *rPf*-MSP1-19 utilizando esporos recombinantes, provavelmente por degradação do antígeno por proteases produzidas pela bactéria.

Nas imunizações intraperitoneais observou-se uma indução de IgG anti- *rPf*-MSP1-19, no grupo imunizado com *rPf*-MSP1-19 acoplada à superfície dos esporos WT autoclavados, resposta muito parecida com a induzida nas imunizações com o controle positivo, composto por adjuvante de Freund e *rPf*-MSP1-19. Desta forma sugere-se o uso de esporos de *B. subtilis Wild Type* autoclavados como alternativa de *delivery* e de adjuvante de antígenos para imunizações com fins experimentais, e futuramente para imunizações em humanos.

6. PERSPECTIVAS

Trabalhos futuros buscarão testar outros antígenos de malária, tanto expressos diretamente na superfície dos esporos, quando acoplados quimicamente à estes, afim de observar se serão capazes de induzir resposta satisfatória. Além disso, outras vias de imunizações serão testadas, como sublingual e nasal.

Em uma colaboração com o Prof. Dr. Cláudio Daniel-Ribeiro do IOC buscaremos testar os resultados positivos obtidos em camundongos em macacos *Saimiri sciureus*

Uma colaboração com a Dra. Daniele Pedroli da UNESP está sendo firmada para o desenvolvimento de cepas de *Bacillus subtilis* capazes de secretar a proteína heteróloga e de *Lactobacillus casei* recombinante.

REFERÊNCIAS

AGNANDJI, S. T. et al. Clinical development of RTS,S/AS malaria vaccine: a systematic review of clinical Phase I–III trials. **Future Microbiol**, v. 10, n. 10, p. 1553–1578, 2015.

AIDE, P. et al. Safety, Immunogenicity and Duration of Protection of the RTS,S/AS02D Malaria Vaccine: One Year Follow-Up of a Randomized Controlled Phase I/IIb Trial. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, p. e13838, 4 nov. 2010.

AMINO R., THIBERGE S., SHORTE S., FRISCHKNECHT F., MÉNARD R. Quantitative imaging of Plasmodium sporozoites in the mammalian host. **C R Biol. Nov**, v. 329(11):858-62. Aug 17, 2006.

BARNES, A. G. C. et al. Bacillus subtilis spores: A novel microparticle adjuvant which can instruct balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 6, p. 1538–1547, 2007.

BLACKMAN, M. J. et al. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. **The Journal of experimental medicine**, v. 172, n. 1, p. 379–82, 1990.

BLACKMAN, M. J. et al. Proteolytic processing of the Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 produces a membrane-bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 49, n. 1, p. 29–33, 1991.

BLACKMAN, M. J. et al. Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface protein. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. July, p. 389–393, 1994.

BRANCH, O. H. et al. Anti-merozoite surface protein-1 19-kDa IgG in mother-infant pairs naturally exposed to Plasmodium falciparum: subclass analysis with age, exposure to asexual parasitemia, and protection against malaria. V. The Asembo Bay Cohort Project. **The Journal of infectious diseases**, v. 181, n. 5, p. 1746–52, maio 2000.

BRAGA E.M., BARROS R.M., REIS T.A., FONTES C.J., MORAIS C.G., MARTINS M.S., KRETTLI A.U. Association of the IgG response to Plasmodium falciparum merozoite

protein(C-terminal 19 kD) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region. **Am J Trop Med Hyg.** v.66(5):461-6, May 2002.

CARTER, R.; MENDIS, K. N. Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 4, p. 564–594, 2002.

COWMAN, A. F. The Plasmodium falciparum Genome-- a Blueprint for Erythrocyte Invasion. **Science**, v. 298, n. 5591, p. 126–128, 4 out. 2002.

COWMAN A.F., CRABB B.S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**, v.124, p.755-766, 2006.

DE SOUZA, R. D. et al. Bacillus subtilis spores as vaccine adjuvants: Further insights into the mechanisms of action. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

DEL RIO B., DATTWYLER R. J., AROSO M., NEVES V., MEIRELLES L, et al. Oral Immunization with Recombinant *Lactobacillus plantarum* Induces a Protective Immune Response in Mice with Lyme Disease. **Clin Vaccine Immunol.** v.15(9): 1429–1435, 2008.

DRIKS, A. **Maximum shields: The assembly and function of the bacterial spore coat****Trends in Microbiology**, 2002.

DUC, L. H. et al. Immunization against anthrax using Bacillus subtilis spores expressing the anthrax protective antigen. **Vaccine**, v. 25, n. 2, p. 346–355, 2007.

DUC, L. H.; CUTTING, S. M. Bacterial spores as heat stable vaccine vehicles. **Expert opinion on biological therapy**, v. 3, n. February, p. 1263–1270, 2003.

EGAN, A. F. et al. Clinical immunity to Plasmodium falciparum malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1. **The Journal of infectious diseases**, v. 173, n. 3, p. 765–9, mar. 1996.

FALAHATI-POUR, S.K.; LOTFI, A.S.; AHMADIAN, G.; BAGHIZADEH, A. Covalent immobilization of recombinant organophosphorus hydrolase on spores of *Bacillus subtilis*. **J Appl Microbiol.** v. 118 (4), p. 976-88. 201 doi: 10.1111/jam.12744.

FERREIRA, M. U. et al. Sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate

merozoite surface protein-1 (MSP-1) of *Plasmodium falciparum*. **Gene**, v. 304, n. 1–2, p. 65–75, 2003.

FERREIRA, M.U., DA SILVA NUNES, M, WUNDERLICH, G. Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites. **Clinical Vaccine Immunology** 11(6): 987, 2004.

FONSECA, J. A. et al. A chimeric protein-based malaria vaccine candidate induces robust T cell responses against *Plasmodium vivax* MSP119. **Scientific Reports**, v. 6, n. October, p. 34527, 2016.

GELLIN, B. G.; SALISBURY, D. M. Communicating the role and value of vaccine adjuvants. **Vaccine**, v. 33, p. B44–B46, 2015.

GOEL, V. K. et al. Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 9, p. 5164–9, 2003.

GOMES, P. A. D. P. et al. Antibody responses elicited in mice immunized with *Bacillus subtilis* vaccine strains expressing Stx2B subunit of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 40, n. 2, p. 333–8, abr. 2009.

GRAVES, P. M.; GELBAND, H. Vaccines for preventing malaria (SPf66). In: GRAVES, P. M. (Ed.). . **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2006.

GUIMARÃES, L. E. et al. Vaccines, adjuvants and autoimmunity. **Pharmacological Research**, v. 100, p. 190–209, 2015.

HARLOW, E.D.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

HERMES, S. C. N. M. et al. Aspectos Epidemiológicos Da Malária Humana No Município De Aripuanã, Estado De Mato Grosso, Brasil, 2005 a 2010. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 9, n. 17, p. 42–51, 2013.

HINC, K. et al. Expression and display of UreA of *Helicobacter acinonychis* on the surface of *Bacillus subtilis* spores. **Microbial cell factories**, v. 9, p. 2, 2010.

HOLDER, A. A. et al. A malaria merozoite surface protein (MSP1)-structure, processing and function. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 37–42, 1992.

ISRAELI, E. et al. Adjuvants and autoimmunity. **Lupus**, v. 18, n. 13, p. 1217–1225, 1 nov. 2009.

ISTICATO, R. et al. Surface display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 21, p. 6294–301, 2001.

ISTICATO, R. et al. Non-recombinant display of the B subunit of the heat labile toxin of *Escherichia coli* on wild type and mutant spores of *Bacillus subtilis*. **Microbial cell factories**, v. 12, n. 1, p. 98, 2013.

KAMALA T. Hock immunization: A humane alternative to mouse footpad injections. **J Immunol Methods** v. 328(1-2): 204–214, 2007.

KARIUKI, M. M. et al. Two *Plasmodium falciparum* merozoite proteins binding to erythrocyte band 3 form a direct complex. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, n. 4, p. 1690–1695, 2005.

KESTER, K. E. et al. Randomized, Double-Blind, Phase 2a Trial of *Falciparum* Malaria Vaccines RTS,S/AS01B and RTS,S/AS02A in Malaria-Naive Adults: Safety, Efficacy, and Immunologic Associates of Protection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 3, p. 337–346, ago. 2009.

KIM, J.; SCHUMANN, W. Display of proteins on *bacillus subtilis* endospores. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 19, p. 3127–3136, 2009.

MATA, E. et al. Malaria vaccine adjuvants: Latest update and challenges in preclinical and clinical research. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

MILLER, L. H. et al. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 673–679, 2002.

MORAIS C.G., SOARES I.S., CARVALHO L.H., FONTES C.J., KRETTLI A.U., BRAGA E.M. IgG isotype to C-terminal 19 kDa of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 among subjects with different levels of exposure to malaria in Brazil. **Parasitol Res.** v.95(6):420-6, Apr2005

MOTA, M. M. et al. Migration of Plasmodium Sporozoites Through Cells Before Infection. **Science**, v. 291, n. 5501, p. 141–4, 2001.

MUELLER, I. et al. Key gaps in the knowledge of Plasmodium vivax, a neglected human malaria parasite. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 9, p. 555–566, 2009.

NEAR, K. A. et al. Improved Immunogenicity and Efficacy of the Recombinant 19-Kilodalton Merozoite Surface Protein 1 by the Addition of Oligodeoxynucleotide and Aluminum Hydroxide Gel in a Murine Malaria Vaccine Model. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 70, n. 2, p. 692–701, 2002.

O'DONNELL, R. A. et al. Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1(19) are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. **The Journal of experimental medicine**, v. 193, n. 12, p. 1403–12, 18 jun. 2001.

PAN, J. G.; KIM, E. J.; YUN, C. H. Bacillus spore display. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 12, p. 610–612, 2012.

PUTAPORNTIP, C. et al. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the Plasmodium vivax merozoite surface protein-1 locus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 25, p. 16348–53, 10 dez. 2002.

SAMBROOK J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3v, 1989.

SIREC T., STRAZZULI A., ISTICATO R., FELICE M., MORACCI M., RICCA E. Adsorption of β -galactosidase of *Alicyclobacillus acidocaldarius* on wild type and mutants spores of *Bacillus subtilis*. **Microbial Cell Factories** V.11:100, 2012

SCHALLMEY, M. et al. Developments in the use of Bacillus species for industrial production. **J. Microbiol**, v. 50, p. 1–17, 2004.

STOUTE, J. A. et al. A Preliminary Evaluation of a Recombinant Circumsporozoite Protein Vaccine against *Plasmodium falciparum* Malaria. **New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 2, p. 86–91, 9 jan. 1997.

TUTEJA, R. Malaria - An overview. **FEBS Journal**, v. 274, n. 18, p. 4670–4679, 2007.

UHLMANN E., VOLLMER J. Recent advances in the development of immunostimulatory oligonucleotides. **Curr Opin Drug Discov Devel** v. 6: 204-217, 2003.

WANG, H.; WANG, Y.; YANG, R. Recent progress in *Bacillus subtilis* spore-surface display: concept, progress, and future. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 3, p. 933–949, 2017.

WASSMER, S.C., TAYLOR, T.E., RATHOD, P.K., et al.: Investigating the Pathogenesis of Severe Malaria: A Multidisciplinary and Cross-Geographical Approach. **Am J Trop Med Hyg.** v 93(3 Suppl): 42–56. 2015.

World Health Organization, 2013. World Malaria Report. disponível em: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013

WU, Z., TANG, Z., SHANG, M. et al. Comparative analysis of immune effects in mice model: *Clonorchis sinensis* cysteine protease generated from recombinant *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* spores. **Parasitol Res** v. 116: 1811, 2017.

YAMAUCHI, L. M. et al. Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site. **Cellular microbiology**, v. 9, n. 5, p. 1215–22, maio 2007.

YAGI M., BANG G., TOUGAN T., PALACPAC N.M., ARISUE N., AOSHI T., et al. Protective epitopes of the Plasmodium falciparum SERA5 malaria vaccine reside in intrinsically unstructured N-terminal repetitive sequences. **PLoS One**, v. 9:00984602014.

ZHOU, Z.; GONG, S.; LI, X.M.; YANG, Y.; GUAN, R.; ZHOU, S.; YAO, S.; XIE, Y.; OU, Z.; ZHAO, J.; LIU, Z. Expression of *Helicobacter pylori* urease B on the surface of *Bacillus subtilis* spores. **J. Med Microbiol**, v. 64 (1) p. 104-10. 2015 doi: 10.1099/jmm.0.076430-0.

ANEXOS

ANEXO 01 – Aprovação do Comitê de Ética INPA



PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA
 MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES
 INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
 ASSESSORIA DE APOIO AOS ÓRGÃOS COLEGIADOS
 COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS

**PARECER CONSUBSTANCIADO E CERTIFICADO SOBRE PROTOCOLOS
 DE PESQUISAS NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação da resposta Imunológica contra esporos de B. Subtilis contendo a proteína MSP1 em sua superfície**", registrada com o nº **053/2016**, sob a responsabilidade de **Kessia Caroline Souza Alves** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA, em reunião de 23/02/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/04/2017 à 30/06/2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo / BALB/C
Número de animais	120
Peso/Idade	6 semanas
Sexo	Feminino
Origem	Biotério Central INPA

Data de liberação do Parecer: 24.02.2017

George Henrique Rebelo
George Henrique Rebelo
 Presidente CEUA-INPA
 PO n. 079/2015

Kessia Caroline Souza Alves
 16/03/2017

ANEXO 2 – Artigo de revisão***Bacillus subtilis*: uma versátil ferramenta biotecnológica¹**

**Kessia Caroline Souza Alves², Maria Edilene Martins de Almeida³, Juliane Correa Glória⁴, Felipe Araújo dos Santos⁵, Keila Dayane Pereira⁶, Diogo Pereira de Castro⁷
Luis André Morais Mariúba⁸**

Resumo

Bacillus subtilis é uma bactéria Gram-positiva, não patogênica, que recebeu o status GRAS (generally regarded as safe) pelo FDA Americano, sendo amplamente utilizada na produção de enzimas extracelulares em escala mundial. Quando exposta à um meio que apresenta deficiência de nutrientes o *B. subtilis* produz um tipo de célula morfológicamente distinta, denominada de esporo. Os esporos de *B. subtilis*, apresentam propriedades de resistência, capazes de sobreviver por longos períodos de tempo sob condições extremas de estresse. Devido a sua estabilidade e segurança, o esporo é uma ferramenta biotecnológica ideal pois suporta alta temperatura, dessecação, ausência de nutrientes e exposição a solventes químicos, tais características, facilitam o armazenamento e o transporte dos mesmos. Além de ter um baixo custo poder ser reutilizado quando acoplado a moléculas. A pesquisa bibliográfica que auxiliou essa revisão foi baseada em artigos científicos publicados em banco de dados eletrônicos, PUBMED e Periódico Capes. Dentre as aplicações dos esporos de *B. subtilis*, destacam-se, a produção de enzimas industriais, produção de proteínas heterólogas, imobilização de moléculas, inseticidas, antibióticos, adjuvante vacinal, entre outras.

Palavras-chaves: *Bacillus subtilis*; esporos; vacina; biotecnologia

¹ Parte da Revisão de Dissertação de Mestrado do primeiro autor em Biotecnologia na Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Manaus, AM, Brasil.

² Biotecnóloga, mestranda na Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas - UFAM. Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200 - Coroado I, Manaus - AM, 69067-005. E-mail: kessiafenty@gmail.com.

³ Bióloga, Doutoranda em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz (IOC- ILMD), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

⁴ Biotecnóloga, mestranda na Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM.

⁵ Biomédico, Apoio Técnico do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manaus-AM.

⁶ Mestre em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus-AM.

⁷ Doutor em Biotecnologia, Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), , Manaus-AM.

⁸ Biotecnologista do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manaus-AM.

Abstract

Bacillus subtilis is a non-pathogenic Gram-positive bacterium which has GRAS status (generally regarded as safe) by American Food and Drug Administration (FDA) and is worldwide used in production of extracellular enzymes. When exposed to a medium deficient in nutrients, *B. subtilis* produces a type of cell morphologically distinct, called spore. The spores of *B. subtilis* have resistance properties, capable of surviving for long periods of time under extreme stress conditions. Due to its stability and safety, the spore is an ideal biotechnological tool. It supports high temperature, desiccation, absence of nutrients and exposure to chemical solvents, such characteristics, facilitate its storage and transport. In addition, it has a low cost and can be reused when coupled to molecules. Bibliographic research which assisted this review was based on scientific articles deposited in online database, PUBMED and Capes Journal. Among the applications of *B. subtilis* spores, production of industrial enzymes, heterologous proteins, immobilization of molecules, insecticides, antibiotics, vaccine adjuvants, among others, are highlighted.

Key-words: *Bacillus subtilis*; spores; vaccine; biotechnology

1. Introdução

Bacillus subtilis é uma bactéria gram-positiva não patogênica, amplamente utilizada na produção de enzimas extracelulares em escala mundial. Esta bactéria recebeu o status GRAS (generally regarded as safe) pelo FDA Americano, é uma das mais estudadas, tendo seu genoma e características bem elucidadas. As culturas dessa bactéria foram muito populares mundialmente antes da introdução dos antibióticos, pois eram utilizadas como agentes imunoestimulantes para auxiliar em tratamentos do trato gastrointestinal em toda América e Europa a partir de 1946.

A aplicação desta bactéria com finalidades industriais datam mais de mil anos, uma vez que a produção de *natto* por fermentação no estado sólido da soja foi realizado pela primeira vez em 1982 no Japão (SCHALLMEY et al., 2004).

O *B. subtilis*, quando submetido a um ambiente escasso em nutrientes, produz uma célula morfológica distinta chamada esporo (WANG; WANG; YANG, 2017). Esses esporos possuem grande resistência, podendo sobreviver extremos de temperaturas (altas ou baixas), além de outras condições adversas. Ademais, *B. subtilis* tem um

histórico de segurança incontestável, pois seus esporos são muito utilizados como probióticos para humanos e animais, em algumas regiões da Ásia e da África, na qual existe um grande consumo de alimentos à base de esporos (DE SOUZA, 2014).

Estudos tem destacado que esporos de *B. subtilis* podem atuar como adjuvantes vacinais, promovendo a elevação da resposta humoral sérica e de mucosa após a co-administração com antígenos tanto acoplados a superfície ou integrados na forma de esporos recombinantes (DE SOUZA et al, 2014; ZHOU et al., 2015). Alguns antígenos foram testados com sucesso em esporos de *B. subtilis*, como os antígenos de *Rotavírus* (LEE et al, 2010), *Helicobacter acinonychis* (HINC et al., 2010), *Escherichia coli* (GOMES et al., 2009; ISTICATO et al, 2013), *Bacillus anthracis* (DUC et al., 2007), Tuberculose (DAS et al., 2016), *Helicobacter pylori* (ZHOU et al., 2015), Tétano (MAURIELLO et al., 2004) entre outros, indicando este sistema como uma excelente metodologia de apresentação vacinal.

Devido a sua estabilidade e segurança, o esporo é uma ferramenta biotecnológica ideal com diversas aplicações potenciais. Esta revisão irá

destacar a utilização dos esporos de *B. subtilis*; na imobilização de moléculas, adjuvantes vacinais e vacinação e alimentação animal.

2. Metodologia

A revisão da literatura sobre *Bacillus subtilis* e suas principais aplicações na área da saúde foi realizado por meio de busca de publicações de pesquisas sobre esporos de *Bacillus subtilis* e vacinas disponíveis em banco de dados eletrônicos, PUBMED e Periódico Capes. O período das publicações foi de 2001 a 2017, cujas palavras-chave foram: “*Bacillus subtilis*”, “Spore”, “Vaccine”, “Spore Display” e “Animal feed”.

3. Aplicações do esporo de *B. subtilis*.

Bacillus subtilis é amplamente utilizado na produção de enzimas extracelulares em escala mundial. Possui atividade industrial devido as várias razões tais como, sua alta taxa de crescimento em ciclos curtos, estabilidade, além de seu status GRAS (*generally regarded as safe*), uma vez que essa espécie é considerada segura e não patogênica para os humanos (SCHALLMEY et al., 2004).

Os esporos de *Bacillus subtilis*, estão envoltos por um revestimento protetor constituído por uma camada

interior e uma externa, sendo composto por mais de 70 proteínas diferentes. Estas proteínas de revestimento, são sintetizadas dentro das células-mãe esporulantes, e são depositadas na superfície dos esporos a medida que os pré-esporos emergem (PAN et al., 2012). Desta maneira ocorre a formação de proteínas de fusão com proteínas de revestimento sendo um método fácil de exibição de proteínas (KIM & SCHUMANN, 2009).

Das proteínas de revestimento que são mais utilizadas para o método de exibição na superfície dos esporos, destacam-se as proteínas de revestimento denominadas de CotB e CotC, sendo as mais utilizadas para produção de proteínas heterólogas (DUC & CUTTING, 2003; ISTICATO et al., 2001).

O método de exibição dos esporos de *Bacillus subtilis*, podem ser obtidos de duas maneiras diferentes. O primeiro, envolve a recombinação da bactéria, realizada por meio da inserção de uma sequência de DNA de interesse no genoma desta, gerando esporos recombinantes sendo que estes apresentam diversas aplicações, como: adjuvantes vacinais, biocatalizadores probióticos para uso em humanos e animais, além de geração e seleção de

bibliotecas de mutagênese. O Segundo método se caracteriza pela adsorção de antígenos e enzimas na superfície dos esporos. Tal abordagem não recombinante parece particularmente adequada para aplicações envolvendo a entrega de moléculas ativas para superfícies de mucosas em humanos ou animais (ISTICATO & RICCA, 2014; RICCA et al., 2014).

Vale ressaltar que os esporos de *B. subtilis*, possuem a vantagem de oferecer propriedades de resistência única, uma vez que são capazes de sobreviver por longos períodos de tempo sob condições extremas de estresse, como alta temperatura, dessecação, ausência de nutrientes e exposição a solventes químicos, tais características, facilitam o armazenamento e o transporte dos esporos (DE SOUZA et al., 2014).

3.1 Esporos para imobilização de Enzimas

O sistema de exibição de moléculas biologicamente ativas na superfície de microrganismos tem sido uma estratégia mais recorrida para várias aplicações biotecnológicas (WU et al., 2008). O esporo de *B. subtilis* vem sendo usado em vários estudos para a expressão superficial de diferentes proteínas alvo, sendo que para a exibição na superfície dos esporos dessas

proteínas alvo, são usados vários motivos de ancoragem, como CotB, CotC, BclA, InhA, CotE e CotG (KIM & SCHUMANN, 2009).

A Proteína A de *Staphylococcus aureus* (SpA) é amplamente utilizada como componente de kits de diagnóstico para a detecção e purificação de IgG a partir de soro ou outros fluidos biológicos.

Em um estudo realizado por Ghaedmohammadi e colaboradores (2015) com a SpA purificada, adsorvida e ligada covalentemente aos esporos de *Bacillus subtilis*, foi observado que a SpA manteve a ligação a IgG após etapas consecutivas de ligação e lavagem, sugerindo que este pode ser reciclado e utilizado várias vezes. Além disso, a análise FACS indicou que os esporos ligados SpA de forma covalentemente melhoraram significativamente as intensidades de fluorescência quando comparados aos esporos com SpA adsorvido espontaneamente. Eles concluíram que em comparação com as matrizes de imobilização convencionais, os esporos apresentam mais vantagens, pelo fato de ter baixo custo, altas taxas de produção e facilidade de manuseio, desse modo o esporo imobilizado com a SpA apresenta potenciais para o

desenvolvimento posterior de pesquisas imunológicas e bioquímicas.

Em outro estudo, a enzima tirosinase - monooxigenase de grande importância industrial, médicas e ambientais - de *Bacillus megaterium* foi imobilizado em esporos de *Bacillus subtilis*, utilizando a proteína CotE como proteína âncora. A expressão da enzima na superfície dos esporos foi confirmada por meio de citometria de fluxo. Os resultados indicaram, que não houve diminuição significativa da atividade enzimática após ser utilizada por mais de três vezes. Além disso, esta manteve a estabilidade podendo ser armazenada a temperatura ambiente. (HOSSEINI-ABARI et al., 2016).

Um outro estudo, buscou estratégias para descontaminar ambientes onde foram utilizados pesticidas organofosforados, muito usado na agricultura.

Para realizar o processo de desintoxicação o método mais aplicado é com a enzima organofosforo hidrolase (OPH), porém uma abordagem ecológica, seria de suma importância para a produção dessa enzima de maneira a mantê-la estabilizada. Neste estudo, os esporos de *B. subtilis* foram aplicados como uma nova matriz para imobilizar OPH, esta enzima foi ligada

covalentemente aos esporos usando EDC-NHS como reagentes de acoplamento e a imobilização foi confirmada por atividade enzimática, transferência de Western, citometria de fluxo e análise microscópica de fluorescência. Foi observado um aumento da estabilidade do pH e térmica da enzima OPH, protegendo do pH ácido e alcalino e de altas temperaturas.

Quando comparado com forma livre, o OPH imobilizado manteve a sua atividade enzimática a altas temperaturas e pH alcalino, bem como o ácido. Assim, foram destacadas as vantagens de se utilizar o OPH imobilizado na superfície do esporo, pois este poderá ser reutilizado sem a perda da atividade enzimática, uma vez observado seu uso por até seis ciclos, além de ter sido aplicado em condições ambientais adversas. (FALAHATI-POUR et al., 2015)

3.2 Esporos como adjuvantes vacinais

As vacinas representam as formas mais eficazes de prevenção de doenças. Um fator importante a ser considerado para o desenvolvimento de uma vacina são imunoestimulantes. Segundo Mata et al.(2013), grande parte dos pesquisadores tem focado seus estudos na identificação do antígeno, mas também avaliar como um antígeno é

apresentado, assim como o efeito imunoestimulatório dos componentes da formulação da vacina. Isso indica a necessidade crítica de adjuvantes mais eficazes, capazes de proporcionar de modo eficiente a produção de células específicas B e T de memória (BARNES et al., 2007).

Um estudo de BARNES et al., (2007), mostrou que os esporos de *B. subtilis*, aumentam de forma eficiente populações de células CD4+ e CD8+ contra o antígeno utilizado (TT: tetanus toxoid fragmente C). Além disso, observaram que os esporos utilizados como adjuvantes, induziram uma resposta *T helper*, sendo elevada por repetidas doses com esporos. Foi observado ainda que administração via nasal, levou o aumento de IgA de mucosa e IgG sistêmico contra o antígeno administrado.

O estudo concluiu que os esporos podem ser utilizados como um novo adjuvante de modo eficaz, sem que haja a necessidade de acoplar o esporo quimicamente com o antígeno alvo, além disso, os esporos induzem o aumento da resposta imune contra os antígenos quando administrada via de mucosa ou sistêmica.

Um outro estudo que também utilizou como antígeno o Fragmento C

da toxina do tétano (TTFC), expresso em esporos de *B. subtilis* pela fusão com a proteína de membrana dos esporos, Cot C. O estudo também utilizou a subunidade B da toxina termolábil de *E. coli* (LTB). As imunizações intraperitoniais, com ambos antígenos apresentados na superfície dos esporos, apresentaram níveis elevados de IgG específicos. Foi observado ainda que os níveis de anti-TTFC se apresentaram superiores aos de anti-LTB, entretanto ambos exibiram resultados significativamente diferentes dos grupos controles.

Além das imunizações intraperitoniais, imunizações orais também foram feitas, onde os níveis de IgG anti-TTFC se mostraram superiores nos camundongos vacinados com esporos recombinantes (CotC-TTFC), apresentando resultado superior ao grupo vacinado com esporos não recombinantes. Já a resposta de IgG sérica anti-LTB, nos camundongos imunizados com esporos (CotC-LTB), não se mostrou significativamente acima da resposta obtida em camundongos imunizados com esporos não recombinantes.

Desta forma, o estudo concluiu que a presença dos antígenos na superfície dos esporos não afeta a estrutura dos

mesmos, além disso constataram que ambos os antígenos mantiveram sua imunogenicidade quando apresentados na superfície dos esporos, induzindo elevados níveis de IgG no soro, significativamente diferentes dos camundongos controles (imunizados com esporos não recombinantes). Demonstrando o grande potencial dos esporos como apresentadores de antígenos heterólogos e utilização no sistema de vacinas MAURIELLO et al., (2004).

Estudo desenvolvido por ZHOU et al., (2015), utilizaram a proteína Urease B de *Helicobacter pylori*, que é crucial para a sobrevivência da bactéria, pois neutraliza a acidez gástrica. Esta foi expressa na superfície dos esporos de *B. subtilis*, através da fusão com a proteína de superfície CotC. Os esporos recombinantes foram utilizados para imunização oral de camundongos, afim de observar a capacidade de induzir uma resposta humoral e de mucosa, em seguida desafiados quanto a redução da carga bacteriana de *H. pylori* no estômago dos animais.

Os resultados obtidos quanto a imunização oral utilizando esporos recombinantes CotC-Urease B, destacaram resposta de IgA fecal específicas para o antígeno testado, os

níveis de IgA foram significativamente maiores no grupo tratado com esporos recombinantes do que no grupo controle (imunizado apenas com esporos não recombinantes). Os níveis séricos de IgG anti-Urease B também foram significativamente maiores nos camundongos imunizados com esporos recombinantes do que nos grupos tratados apenas com esporos não recombinantes.

Os camundongos desafiados por *H. pylori*, 2 semanas após a última imunização com esporos CotC-Urease B, apresentaram uma redução significativa de 84% da carga bacteriana do estômago em comparação com o grupo tratado com esporos não recombinantes. Desta forma, o estudo sugeriu que a administração oral de esporos recombinantes pode induzir não só imunidade mucosa como também sistêmica, além de ser capaz de fornecer proteção contra *H. pylori*.

A metodologia de apresentação de antígenos por esporos recombinantes também foi testada para a Tuberculose, visto que, a atual vacina BCG, não é totalmente protetora contra tuberculose. DAS e colaboradores (2016) desenvolveram estudo, a fim de encontrar uma nova formulação de vacina para a doença. Uma alternativa

foi a utilização de esporos de *Bacillus subtilis* para expressão de dois antígenos principais (Ag85B e o CPF10) imunodominantes de *Mycobacterium tuberculosis*.

Os anticorpos IgG produzidos em camundongos imunizados por via intranasal, foram específicos para T85BCFP (fusão dos antígenos Ag85B e CPF10 expressos em *B. subtilis*), não havendo diferenças importantes nos níveis de IgG entre eles. Camundongos imunizados com BCG apresentaram níveis de anticorpos semelhantes aos imunizados com esporos recombinantes. Em conclusão, o estudo indicou que os esporos podem ser projetados como forma de administrar os antígenos de *M. tuberculosis* no sistema imunológico de mucosa, apresentando assim, uma nova via para desenvolvimento de vacinas eficazes contra tuberculose.

Lee e colaboradores (2010) utilizou cepas de *Bacillus subtilis*, modificadas para expressar a proteína VP6 de Rotavírus, buscando induzir respostas imunes e proteção contra Rotavírus após desafio. Foram inoculados, via nasal em camundongos, esporos ou as células vegetativas da cepa recombinante de *Bacillus subtilis*, além disso, para aumentar a imunidade de mucosa, foram adicionados como

adjuvantes aos inóculos a Toxina da cólera (CT) ou a forma mutante da Toxina termolábil de *Escherichia coli* (mLT). Os camundongos imunizados foram posteriormente desafiados com Rotavírus murino EDIM EW, e monitorados diariamente durante 7 dias quanto a perda de vírus nas fezes.

Os camundongos imunizados com células vegetativas recombinantes e esporos recombinantes apresentaram aumento nos níveis de IgG sérico anti-VP6, ao passo que apenas a vacina contendo esporos-VP6 geraram IgA anti-VP6 fecal. Camundongos imunizados com esporos-VP6 mais CT ou mLT, mostraram considerável redução nos níveis de vírus detectados nas fezes, enquanto que os animais vacinados com células vegetativas recombinante não demonstraram redução nos níveis de vírus, em comparação com camundongos controles. O estudo concluiu assim, que a inoculação intranasal de vacinas baseadas em esporos de *B. subtilis*, contra rotavírus, é eficaz na indução de imunidade protetora contra o patógeno quando desafiado pelo mesmo.

3.3 Vacinação e alimentação animal

Os esporos de *B. subtilis* são promissores como apresentadores de antígenos não só para vacinas em seres

humanos, mas também para imunizações de animais, podendo ser amplamente utilizado na pecuária, sendo método alternativo capaz de tornar barata e eficaz para as imunizações.

Um dos grandes problemas enfrentados pela indústria avícola é a gripe aviária, a qual apresenta uma ameaça mundial e impacto sobre a economia. Sendo que a imunização existente para combater a doença pode inibir o crescimento das aves e ainda não induzir imunidade de mucosa suficiente (NIU et al., 2009).

Sendo assim, um estudo de MOU e colaboradores (2016), construíram uma cepa recombinante de *Bacillus subtilis* (BS-HA), capaz de expressar a proteína hemaglutinina (HA), do vírus (HPAI) H5N1. Após as imunizações orais feitas em galinhas, observaram níveis elevados específicos de IgA de mucosa que aumentaram consideravelmente 3 a 5 semanas após a vacinação oral com BS-HA em comparação com as imunizações com PBS ou BS.

Os níveis de IgG séricos foram detectados de 1-7 semanas após a primeira imunização, atingindo o pico de 3-5 semanas após a vacinação com BS-HA, sendo maiores em comparação com as imunizações com PBS ou BS. Além disso, foram observados aumento de

peso considerável nas galinhas, após a imunização com BS ou BS-HA, em relação aos demais grupos. Sendo assim, o estudo concluiu que os títulos de IgG e IgA específicos foram impulsionados pela imunização oral com BS-HA, indicando que o *B. subtilis* recombinante efetivamente estimulou resposta imune sistêmica.

Pesquisas anteriores indicaram que a implementação de *B. subtilis* na dieta de animais, exerce um efeito benéfico na microbiota intestinal, aumentando o desempenho do crescimento e melhorando a proporção de conversão alimentar dos mesmos (LEI et al., 2015). Este efeito do *B. subtilis* é devido sua capacidade de produzir amilase, lipase, protease e aminoácidos, o que é capaz de aumentar a eficiência da digestão e absorção de nutrientes (PEDROSO et al., 2006).

LIU e colaboradores (2017), avaliaram as propriedades probióticas de *Bacillus subtilis* HAINUP40 isoladas de meio aquático e as consequências da administração dietética da mesma sobre o desempenho de crescimento, recuperação probiótica intestinal, atividades enzimáticas digestivas, imunidade inata e resistência à doença da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Após a suplementação alimentar das

Tilápias com *B. subtilis* HAINUP40 por 8 semanas, o peso corporal final (porcentagem de ganho de peso e taxa de crescimento específica), foram significativamente maiores, entretanto suas taxas de conversão alimentar foram menores, em comparação com o grupo controle. O teste de desafio mostrou que a suplementação utilizando *B. subtilis* HAINUP40 aumentou a proteção contra infecção por *Streptococcus agalactiae*. Os peixes que receberam dieta suplementada, apresentaram menor mortalidade acumulada (40%) do que observado no grupo controle (85%) sendo a porcentagem relativa de sobrevivência (PRS%) foi de 52%.

O estudo concluiu que *Bacillus subtilis* exibe, de fato, a maioria das propriedades de um bom probiótico. A administração oral de *B. subtilis* HAINUP40 melhorou o desempenho do crescimento da Tilápia e as atividades enzimáticas digestivas, além de melhorar a imunidade e resistência contra doença causada por *S. agalactiae*, se mostrando uma metodologia ideal para aumentar o crescimento e resistência imune para Tilápia do Nilo.

4. Considerações Finais

Considerando o exposto, fica claro o grande potencial de aplicação dos *Bacillus subtilis* tanto para a indústria,

saúde humana e animal. Os relatos encontrados na literatura, demonstram grandes benefícios na utilização dos esporos tanto manipulados geneticamente como submetido a adsorção física ou química da molécula em estudo, seja para fins vacinais e imobilização de enzimas.

A esta capacidade adjuvante e de superfície de adsorção soma-se a elevada resistência térmica, a extremos de pH e pressão. Maiores estudos devem ser realizados buscando investigar tanto novas rotas de recombinação quanto de aplicação desta ferramenta polivalente.

Divulgação

“Este artigo de revisão é inédito. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, desta revisão, por meio eletrônico”.

Referências

- BARNES AG, CEROVIC V, HOBSON PS, KLAVINSKIS LS. *Bacillus subtilis* spores: a novel microparticle adjuvant which can instruct a balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 6, p. 1538–1547, 2007.
- DAS, K.; THOMAS, T.; GARNICA, O.; DHANDAYUTHAPANI, S. Recombinant *Bacillus subtilis* spores for the delivery of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B-CFP10 secretory antigens. *Tuberculosis (Edinb)*. v. 101S:S18-S27. 2016. doi: 10.1016/j.tube.2016.09.016.
- DE SOUZA, R.D.; BATISTA, M.T.; LUIZ, W.; CAVALCANTE, R.C.; AMORIM, J.H.; BIZERRA, R.S.; MARTINS, E.G.; FERREIRA, L.C. *Bacillus subtilis* spores as vaccine adjuvants: further insights into the mechanisms of action. **PLoS One**, v. 27;9(1):e87454, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0087454.
- DUC LE, H.; HONG, H.A.; ATKINS H.S.; FLICK-SMITH, H.C.; DURRANI, Z.; RIJKEMA, S.; TITBALL, R.W.; CUTTING, S.M. Immunization against anthrax using *Bacillus subtilis* spores expressing the anthrax protective antigen. **Vaccine**. v. 25 (2), p. 346-55, 2007.
- DUC, L.H.; CUTTING, S.M. Bacterial spores as heat stable vaccine vehicles. **Expert opinion on biological therapy**, v. 3, n. p. 1263–1270, 2003.
- FALAHATI-POUR, S.K.; LOTFI, A.S.; AHMADIAN, G.; BAGHIZADEH, A. Covalent immobilization of recombinant organophosphorus hydrolase on spores of *Bacillus subtilis*. **J Appl Microbiol**. v. 118 (4), p. 976-88. 2015 doi: 10.1111/jam.12744.
- GHAEDMOHAMMADI, S.; RIGI, G.; ZADMARD, R.; RICCA, E.; AHMADIAN, G. Immobilization of Bioactive Protein A from *Staphylococcus aureus* (SpA) on the Surface of *Bacillus subtilis* Spores. **Mol Biotechnol**, v. 57 (8), p. 756-66, 2015.
- GOMES, P.A.; BENTANCOR, L.V.; PACCEZ, J.D.; SBROGIO-ALMEIDA, M.E.; PALERMO, M.S.; FERREIRA, R.C.; FERREIRA, L.C. Antibody responses elicited in mice immunized with *Bacillus subtilis* vaccine strains expressing Stx2B subunit of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Braz J Microbiol**, v. 40, n. 2, p. 333–8, 2009. doi: 10.1590/S1517-838220090002000023.
- HINC, K.; ISTICATO, R.; DEMBEK, M.; KARCZEWSKA, J.; IWANICKI, A.; PESZYŃSKA-SULARZ, G.; DE FELICE M.; OBUCHOWSKI, M.; RICCA E. Expression and display of UreA of *Helicobacter acinonychis* on the surface of *Bacillus subtilis* spores. **Microb Cell Fact**. v. 18, p. 9-2, 2010. doi: 10.1186/1475-2859-9-2.
- HOSSEINI-ABARI, A.; KIM, B.G.; LEE, S.H.; EMTIAZI, G.; KIM, W.; KIM, J.H. Surface display of bacterial tyrosinase on spores of *Bacillus subtilis* using CotE as an anchor protein. **J Basic Microbiol**, v. 56 (12), p.1331-1337, 2016. doi: 10.1002/jobm.201600203.
- ISTICATO, R.; CANGIANO, G.; TRAN, H.T.; CIABATTINI, A.; MEDAGLINI, D.; OGGIONI, M.R.; DE FELICE, M.; POZZI, G.; RICCA, E. Surface display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores. **J Bacteriol**, v. 183, n. 21, p. 6294–301, 2001.
- ISTICATO, R.; RICCA, E. Spore Surface Display. **Microbiol Spectr**. v.

- 2(5), 2014. doi: 10.1128/microbiolspec.TBS-0011-2012. ISTICATO, R.; SIREC, T.; TREPPICIONE, L.; MAURANO, F.; DE FELICE, M.; ROSSI, M.; RICCA, E. Non-recombinant display of the B subunit of the heat labile toxin of *Escherichia coli* on wild type and mutant spores of *Bacillus subtilis*. **Microb Cell Fact.** v.29, p.12-98. 2013.
- KIM, J.; SCHUMANN, W. Display of proteins on *Bacillus subtilis* endospores. **Cell Mol Life Sci.** v. 66 (19), p. 3127-36, 2009. doi: 10.1007/s00018-009-0067-6.
- LEE, S.; BELITSKY, B.R.; BRINKER, J.P.; KERSTEIN, K.O.; BROWN, D.W.; CLEMENTS, J.D.; KEUSCH, T.; TZIPORI, S.; SONENSHEIN, A.L.; HERRMANN, J.E. Development of a *Bacillus subtilis*-based rotavirus vaccine. **Clin Vaccine Immunol,** v. 17(11), p.1647-55, 2010. doi: 10.1128/CVI.00135-10.
- LEI, X.; PIAO, X.; RU, Y.; ZHANG, H.; PÉRON, A.; ZHANG, H. Effect of *Bacillus amyloliquefaciens*-based Direct-fed Microbial on Performance, Nutrient Utilization, Intestinal Morphology and Cecal Microflora in Broiler Chickens. **Asian-Australas J Anim Sci,** v. 28(2), p. 239-46. 2015. doi: 10.5713/ajas.14.0330.
- LIU, H.; WANG, S.; CAI, Y.; GUO, X.; CAO, Z.; ZHANG, Y.; LIU, S.; YUAN, W.; ZHU, W.; ZHENG, Y.; XIE, Z.; GUO, W.; ZHOU, Y. Dietary administration of *Bacillus subtilis* HAINUP40 enhances growth, digestive enzyme activities, innate immune responses and disease resistance of tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish Shellfish Immunol,** v. 60, p. 326-333, 2017. doi: 10.1016/j.fsi.2016.12.003.
- MATA, E.; SALVADOR, A.; IGARTUA, M.; HERNÁNDEZ, R.M.; PEDRAZ, J.L. Malaria vaccine adjuvants: latest update and challenges in preclinical and clinical research. **Biomed Res Int,** v. 2013, 2013. doi: 10.1155/2013/282913.
- MAURIELLO, E.M.; DUC, L.E.H.; ISTICATO, R.; CANGIANO, G.; HONG, H.A.; DE FELICE, M.; RICCA, E.; CUTTING, S.M. Display of heterologous antigens on the *Bacillus subtilis* spore coat using CotC as a fusion partner. **Vaccine,** v. 12;22(9-10), p.1177-87, 2004.
- MOU, C.; ZHU, L.; YANG, J.; XU, W.; CHENG, X.; YANG, Q. Immune Responses Induced by Recombinant *Bacillus Subtilis* Expressing the Hemagglutinin Protein of H5N1 in chickens. **Sci Rep.** v.16(6), p. 38403. 2016. doi: 10.1038/srep38403.
- NIU, Z. Y.; LIU, F. Z.; YAN, Q. L. & LI, W. C. *Effects of different levels of vitamin E on growth performance and immune responses of broilers under heat stress.* **Poultry Science,** v. 88, p. 2101–2107, 2009. doi: 10.3382/ps.2009-00220
- PAN, J.G.; KIM, E.J.; YUN, C.H. *Bacillus* spore display. **Trends in Biotechnology,** v. 30, n. 12, p. 610–612, 2012.
- PEDROSO, A.A.; MENTEN, J.F.; LAMBAIS, M.R.; RACANICCI, A.M.; LONGO, F.A.; SORBARA, J.O. Intestinal bacterial community and growth performance of chickens fed diets containing antibiotics. **Poult Sci,** v. 85(4), p.747-52, 2006.
- RICCA, E.; BACCIGALUPI, L.; CANGIANO, G.; DE FELICE, M.;

ISTICATO, R. Mucosal vaccine delivery by non-recombinant spores of *Bacillus subtilis*. **Microb Cell Fact**, v. 12, p. 13-115, 2014. doi: 10.1186/s12934-014-0115-2.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O.P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Can J Microbiol**. v.50 (1), p.1-17, 2004.

WANG, H.; WANG, Y.; YANG, R. Recent progress in *Bacillus subtilis* spore-surface display: concept, progress, and future. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.101(3), p. 933-949, 2017. doi: 10.1007/s00253-016-8080-9.

WU, C.H.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Versatile microbial surface-display for environmental remediation and biofuels production. **Trends Microbiol**, v. 16(4), p. 181-8, 2008. doi: 10.1016/j.tim. 2008.01.003.

ZHOU, Z.; GONG, S.; LI, X.M.; YANG, Y.; GUAN, R.; ZHOU, S.; YAO, S.; XIE, Y.; OU, Z.; ZHAO, J.; LIU, Z. Expression of *Helicobacter pylori* urease B on the surface of *Bacillus subtilis* spores. **J. Med Microbiol**, v. 64 (1) p. 104-10. 2015 doi: 10.1099/jmm.0.076430-0.

ANEXO 03 – Artigos publicados durante o Mestrado.



Scientia Amazonia, v. 7, n.1, 53-59, 2018

Revista on-line <http://www.scientia-amazonia.org>

ISSN:2238.1910

Nanotubos de carbono: conceitos gerais e aplicação em biosensores¹

Stefane Pereira Reis², Juliane Corrêa Glória³, Maria Edilene Martins de Almeida⁴, Felipe Araujo⁵, Késsia Caroline Souza Alves³, Keila Dayane do Espírito Santo Pereira³, Lizandro Manzato⁶, Luis André Morais Mariúba⁷

Submetido 28/09/2017 – Aceito 30/09/2017 – Publicado on-line 03/01/2018

RESUMO

Desde que foram descobertos, os nanotubos de carbono têm despertado o interesse de muitos pesquisadores devido às suas propriedades físicas, químicas e eletrônicas que possibilitam sua aplicação nas mais diversas áreas de conhecimento, incluindo aplicações biomédicas. Este trabalho buscou levantar conceitos básicos sobre estas nanopartículas, a problemática envolvendo seu uso e sua aplicação em sistemas de detecção rápida de biomoléculas.

Palavras-chave: Nanotecnologia, nanotubos de carbono, biosensores

Carbon nanotubes: general concepts and application in biosensors. Carbon nanotubes have attracted many researchers because of their physical, chemical and electronic properties that allow their application in the most diverse areas of knowledge, including biomedical applications. This study aimed to raise basic concepts of these nanoparticles, the problematic involving its use and application in rapid analyte detection systems.

Keywords: nanotechnology, carbon nanotubes, biosensors

¹ Parte da Revisão de Dissertação de Mestrado do primeiro autor em Saúde Sociedade e Endemias na Amazônia da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Manaus, AM, Brasil

² Biomédica com mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia pela Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, AM, Brasil

³ Alunas de mestrado do Programa de pós-graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC) da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Manaus, AM, Brasil.

^{4 e 5} Bolsistas de apoio técnico no Instituto Leônidas e Maria Deane – Fundação Oswaldo Cruz, Manaus, AM, Brasil

⁶ Coordenador do Laboratório de Síntese e Caracterização de Nanomateriais (LSCN) do IFAM, Manaus, AM, Brasil

⁷ Tecnologista no Instituto Leônidas e Maria Deane – Fundação Oswaldo Cruz, Manaus, AM, Brasil



Anaplasma marginale: aspectos gerais, diagnóstico e controle¹

Keila Dayane do Espírito Santo Pereira²; Maria Edilene Martins de Almeida³, Késsia Caroline Souza Alves⁴, Juliane Corrêa Glória⁵, Alex Cangussu⁶, Luís André Moraes Mariúba⁷, Paulo Afonso Nogueira⁸.

Submetido 10/01/2018 – Aceito 12/01/2018 – Publicado on-line 04/01/2018

Resumo

Anaplasmosose é uma doença que acomete animais ruminantes, especificamente bovinos, gerando prejuízos econômicos no Brasil. Dentre os sinais clínicos apresentados, o de maior ênfase é a febre que caracteriza altos picos de parasitemia assim como a anemia que pode levar o animal a óbito. As formas de combate à doença se baseiam em medidas profiláticas, e os produtos comerciais disponíveis no mercado não são eficientes. Os frequentes avanços da ciência podem levar a novos caminhos para o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra Anaplasmosose, capaz de induzir a resposta imune protetora. Com base nas terapêuticas atuais, este estudo traz um levantamento de novas propostas e estratégias de vacinas eficazes para resposta imune humoral contra Anaplasmosose utilizando proteínas de superfície (MSPs), vacinas de tecnologia de DNA recombinante (TDR) baseadas em seleção de epitopos de células B.

Palavras-Chave: *Anaplasma marginale*, Bovinos, MSPs, vacinas recombinantes.

Anaplasma marginale: general aspects, diagnosis and control. Anaplasma marginale: advances in understanding of the protective immune response. Anaplasmosis is a disease that affects ruminant animals, specifically cattle in Brazil generating economic losses. Among the clinical signs presented, the emphasis is fever that characterizes high parasitaemia peaks as well as anemia that can lead the animal to death. Ways to fight the disease through preventive measures and existing commercial products on the market are not effective. Today, advances in research methods may lead to new avenues in the development, protection, control and prevention through effective Anaplasmosis vaccine capable of inducing a protective immune response. Based on current therapies this study provides a survey of new proposals and effective vaccine strategies for humoral immune response against Anaplasmosis using surface proteins (MSPs), DNA Technology Recombinant Vaccine (TDR) vaccines based on selection of B-cell epitopes.

Palavras-Chaves: *Anaplasma marginale*, Cattle, MSPs, Recombinant vaccines.

¹ Parte da Revisão de Dissertação de Mestrado do primeiro autor em Biotecnologia na Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Manaus, AM, Brasil.

² Professora da Escola Superior Batista do Amazonas.

³ Bióloga, Doutoranda em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz (IOC- ILM), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

⁴ Biotecnóloga, mestranda na Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas - UFAM. Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200 - Coroado I, Manaus - AM, 69067-005. E-mail: kessiafenty@gmail.com.

⁵ Biotecnóloga, mestranda na Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM.

⁶ Bolsista de Iniciação Científica pelo Instituto Leônidas e Maria Deane - Fiocruz Amazônia

⁷ Biotecnologista do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manaus-AM.

⁸ Pesquisador do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manaus-AM.

