

## Acción adyuvante de esporas de *Bacillus subtilis* por vía mucosa

Fabiana Tub-Chafer,<sup>1\*</sup> Laura María Reyes-Díaz,<sup>2</sup> Irma Gudelia Vega-García,<sup>1</sup> Elizabeth González-Aznar,<sup>2</sup> Oscar Otero-Alfaro,<sup>2</sup> Jairo Lumpuy-Castillo,<sup>1</sup> Roberto Ricardo-Grau,<sup>3</sup> Oliver Pérez<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas y Facultad de Ciencias Médicas “Victoria de Girón”, Universidad de Ciencias Médicas de la Habana, La Habana, Cuba.

<sup>2</sup> Instituto Finlay, La Habana, Cuba.

<sup>3</sup> Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

**email:** dcastillo092@gmail.com; oliverperez@giron.sld.cu

---

Las esporas de *Bacillus subtilis*, generalmente reconocidas como seguras, han recibido una creciente atención en aplicaciones biotecnológicas en formulaciones vacunales, sobre todo como adyuvantes. Este trabajo presenta una revisión actualizada de la acción adyuvante de las esporas de *B. subtilis* y conjuntamente se expone nuestra experiencia por vía oral (o.r) e intranasal (i.n) como adyuvante frente antígenos modelos ovoalbúmina (Ova) y toxoide tetánico (TT). Se realizó una revisión documental sobre *B. subtilis*, adyuvante, vacuna y vía mucosal en MEDLINE a través de PubMed; también se revisaron las bases de datos SciELO y LILACS. Para la exploración de la capacidad adyuvante se trabajó con esporas de *B. subtilis* (cepa RG 4365). Se inmunizaron ratones Balb/c por vía mucosal con esporas coadministradas con los antígenos modelos, y se midió las respuesta de anticuerpos específicos en suero, saliva y heces por método de ELISA. La revisión realizada evidenció la existencia de varios trabajos que utilizan las esporas de *B. subtilis* por diferentes metodologías y vías de administración como adyuvante, siendo la expresión de antígenos recombinantes la más utilizada, así como la vía o.r entre la aplicación mucosa. En nuestro trabajo se obtuvo un aumento de la respuesta sérica de IgG, subclases IgG1 e IgG2a y de IgA específicos en saliva y heces en los grupos inmunizados con esporas coadministradas con Ova y con TT por ambas vías, significativamente superior a los grupos controles ( $p < 0,05$ ). Estos datos sugieren que las esporas son eficientes adyuvantes pues aumentan la respuesta inmune humoral sistémica y mucosal y resalta su potencial clínico en futuras vacunas mucosales.

**Palabras claves:** *Bacillus subtilis*, adyuvantes, vacunas, vía mucosal.

---

### Introducción

Aunque la mayoría de las vacunas actuales se administran de forma sistémica, no son eficaces contra las infecciones mucosas. Una vacuna mucosa eficaz debe proporcionar protección no sólo en el sitio de entrada, sino también a nivel sistémico. La vacunación por vía mucosal puede inducir respuestas inmunes a ambos niveles; en las superficies mucosas, donde normalmente produce anticuerpos de clase IgA secretorios (IgAS) y a nivel sérico, a través de la producción de IgG sistémica.

Los isotipos de anticuerpos mayormente encontrados en los sitios mucosos y en las secreciones externas son de la clase IgAS, donde predomina la forma dimérica. Una respuesta inmune mucosal robusta se manifiesta por respuestas de IgAS específicos elevados, así como una respuesta mixta Th1/Th2 como reflejo del aumento de citocinas como el IFN- $\gamma$  y la IL-2 y una proporción del balance IgG1:IgG2a equilibrada. Los anticuerpos de

clase IgAS son considerados los mayores efectores en la defensa inmune adaptativa del sistema mucoso (1).

La comprensión sobre la inmunidad a nivel de las mucosas y el desarrollo de vacunas a éste nivel han enfrentado grandes desafíos, debido a los resultados imprevisibles relacionados con el complejo sistema inmune mucoso.

Este se ha modificado para evitar la invasión y la colonización subsiguiente de los microorganismos patógenos, controlar su transmisión entre los individuos y prevenir las reacciones inmunes perjudiciales contra los antígenos de los alimentos y las bacterias comensales (2).

El microambiente local, la naturaleza y la ruta de entrega del antígeno son determinantes en el desarrollo de las respuestas mucosas. Recientes estudios se han enfocado en vacunas mucosas capaces de inducir respuestas eficaces a éste nivel y sistémicas (3).

---

\* Doctora en medicina, Especialista en I grado en MGI e Inmunología, Profesor Instructor.

\*\* Doctor en medicina, Especialista en II grado en Inmunología y Microbiología, Dr. C. Médicas, Profesor e Investigador Titular

La ruta intranasal (i.n) induce respuestas robustas de IgAS mucosa e IgG sistémica y requiere menores concentraciones de antígeno que la oral (o.r). Sin embargo, los efectos neurológicos por el paso retrógrado de antígenos/adyuvantes por ésta vía al sistema nervioso central debido a la proximidad de los bulbos olfatorios han limitado el desarrollo de vacunas i.n (3).

Un objetivo en el desarrollo de las vacunas es identificar nuevos adyuvantes que refuerzan la actividad inmunogénica de los antígenos poco inmunogénicos. Las vacunas son eficaces principalmente para prevenir las enfermedades infecciosas (4). Sin embargo, las vacunas purificadas inducen baja inmunidad por lo que necesitan de adyuvantes para generar respuestas inmunes robustas. Los adyuvantes se clasifican, según su mecanismo de acción, como: sistemas de liberación, inmunopotenciadores e inmunopolarizadores (5, 6).

El uso de bacterias vivas como sistemas de entrega de antígenos ha proporcionado una herramienta para el desarrollo de nuevas vacunas cada vez más eficaces. Las esporas bacterianas han mostrado gran potencial como vehículos para la entrega de antígenos heterólogos. Las esporas de *B. subtilis* pueden germinar en el intestino murino lo que mantiene una ruta adicional de entrega para los antígenos (7).

*B. subtilis* es una bacteria Gram positiva que se usa actualmente como probiótico y aditivos de alimentos y por consiguiente tiene una seguridad probada en humanos. Este tiene la ventaja de sobrevivir de forma metabólicamente inactiva, indefinidamente en el medio externo frente a condiciones adversas.

Estas esporas se han empleado por vía o.r, pero su uso por vía i.n ha sido menos explorada (7). *B. subtilis* es un comensal, no invasivo, perteneciente al grupo de comensales denominados GRAS (generalmente reconocidos como seguros) y altamente termoestable. Por ello, puede ser utilizado como sistema de entrega de vacunas, seguras y de bajo costo (3, 4). Donde, además de generar respuestas inmunes protectoras, presenta otras ventajas como son: la entrega del antígeno en el sitio de inmunización; minimiza la necesidad de la purificación y concentración durante la producción, la esterilización, el empaquetamiento del antígeno y la inclusión de otros adyuvantes (4).

En este trabajo revisamos la acción adyuvante de las esporas de *B. subtilis* y exponemos nuestra experiencia al respecto al ser aplicados por vía o.r, e incursionamos

en la vía i.n frente a antígenos modelos poco inmunogénicos como la ovoalbúmina (Ova) y vacunales altamente inmunogénicos como es el toxoide tetánico (TT).

## Materiales y Métodos

Se realizó una investigación estructurada en dos fases. La primera realizó una revisión documental sobre el tema. Para la obtención de los descriptores apropiados de búsqueda se utilizó como fuentes principales de información las palabras clave: *Bacillus subtilis*, adyuvante, vacuna, vía mucosal. Las búsquedas de estudios se realizaron en MEDLINE a través de PubMed; también se revisaron las bases de datos SciELO y LILACS.

La revisión estuvo comprendida entre el período de enero del 2013 a julio del 2015. Se realizó una lectura crítica para determinar cuales se ajustaban a los objetivos de esta publicación. Los datos recuperados fueron revisados manualmente, eliminando aquellas referencias no relacionadas. Luego se realizó una base de datos en Excel con la información pertinente de cada artículo y se llevó a cabo la sistematización de los elementos básicos para permitir su recuento y análisis. Finalmente la muestra quedó constituida por 19 trabajos.

La segunda fase fue la exploración de la capacidad adyuvante de las esporas, mediante nuestra experiencia por vía o.r e i.n, como adyuvante frente a antígenos modelos poco inmunogénicos (Ova) y vacunales altamente inmunogénicos (TT). Se trabajó con las esporas de *B. subtilis* (cepa RG 4365) donada por el Dr. Roberto Ricardo Grau, del Dpto. de Microbiología de la Facultad de Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

### Obtención de las esporas

Las esporas se cultivaron en medio Nutrient Broth (8 g/L, Difco) suplementado con KCl 1 g/L y MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,25 g/L a pH 7,2 durante 48 h a 37°C, con agitación continua en zaranda a 180 revoluciones por minuto (rpm). Después de 48 h de cultivo, se colectó el medio y se centrifugó a 1620 g durante 30 min y se desechó el sobrenadante. La biomasa obtenida se lavó tres veces con solución salina tamponada de fosfato (SSTF): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3,2 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 mM; KCl 1,3 mM; NaCl 135 mM, pH 7,4 mediante centrifugación a 1620 g durante 15 min. Después del último lavado, la biomasa final se pesó para calcular el rendimiento y se tomó una alícuota para el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

## Animales de experimentación

Los diferentes protocolos de inmunización se llevaron a cabo en ratones Balb/c procedentes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Mayabeque, Cuba). Los animales empleados fueron hembras de 6-8 semanas, con  $20 \pm 2$  g de peso corporal al inicio de los ensayos.

Los animales permanecieron bajo condiciones controladas de temperatura (21-24°C) y humedad (20-25%), con ciclo alternado de luz/oscuridad de 12 h y recibieron alimentación y agua acidulada con HCl a un pH 2,5 *ad libitum*.

## Protocolos de Inmunización

Se emplearon 12 grupos de ratones hembras Balb/c con cinco animales cada uno. Las vías de inmunización empleada fueron la i.n y la o.r, administrando un volumen total de 25  $\mu$ L por vía i.n (12,5  $\mu$ L en cada fosa nasal) y 100  $\mu$ L por la vía o.r.

En todos los casos se emplearon tres dosis con intervalos de siete días entre ellas (0, 7 y 14). Los antígenos utilizados fueron Ova y TT, poco y muy inmunogénico respectivamente (Tablas 1 y 2).

**Tabla 1.** Exploración de la capacidad adyuvante de esporas de *Bacillus subtilis* frente a Ovalbúmina (Ova) vía intranasal (i.n) y oral (o.r). UFC, unidades formadoras de colonias.

Grupos	N	Vías	Formulación	Concentración (UFC + $\mu$ g/mL)
1	5	i.n	Esporas+Ova	$1 \times 10^9 + 10/25$
2	5	i.n	Ova	10/25
3	5	i.n	PBS	25
4	5	o.r	Esporas+Ova	$1 \times 10^9 + 20/100$
5	5	o.r	Ova	20/100
6	5	o.r	PBS	100

PBS = Tampón Fosfato Salino.

**Tabla 2.** Exploración de la capacidad adyuvante de esporas de *Bacillus subtilis* frente a Toxoide Tetánico (TT) vía intranasal (i.n) y oral (o.r). UFC, unidades formadoras de colonias. Lf, Unidades de floculación.

Grupos	N	Vías	Formulación	Concentración (UFC + $\mu$ g/mL)
1	5	i.n	Esporas+TT	$1 \times 10^9 + 5/25$
2	5	i.n	TT	5/25
3	5	i.n	PBS	25
4	5	o.r	Esporas+TT	$1 \times 10^9 + 10/100$
5	5	o.r	TT	10/100
6	5	o.r	PBS	100

PBS = Tampón Fosfato Salino.

## Respuesta Inmune evaluada

En los animales inmunizados y controles se evaluaron las respuestas de anticuerpos específicos anti Ova o TT inducidas: en suero (IgG y subclases IgG1 e IgG2a) a los 14 días después de la última dosis; en saliva (IgA) a los siete días después de la última dosis administrada y en las heces (IgA) a los 14 días después de la última dosis.

## Toma de muestra

La extracción de sangre se realizó mediante punción retroorbital, utilizando capilares heparinizados. Las muestras de sangre obtenidas se incubaron durante 1 h a 37°C y posteriormente, se centrifugaron a 800 g durante 20 min para extraer el suero, que se conservó a -20°C hasta su evaluación. Para la toma de muestra de saliva, se estimuló la salivación en los animales con la aplicación intraperitoneal de 50  $\mu$ L por ratón de Pilocarpina (Quimefa, Cuba) al 0,5%.

Las muestras se colectaron en una solución con inhibidores de proteasas (1 mM phenylmethyl sulfonylfluoride en ethanol, 5  $\mu$ g/mL de aprotinina, 1  $\mu$ g/mL de leupeptina, antipaina y pepstatina. Sigma). Seguidamente fueron centrifugadas a 9500 g durante 15 min a 4°C, se colectó

el sobrenadante y se conservó en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su evaluación.

Las heces fueron recolectadas tomando de 3 a 6 piezas de heces frescas en viales previamente pesados, resuspendidas en la solución de inhibidores de proteasas, en agitación fuerte en una proporción de 20  $\mu\text{L}$  por mg de heces. Los viales con las mezclas homogéneas fueron centrifugados a 10000 g por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , recolectando el sobrenadante, el cual fue conservado en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su evaluación.

### ***Ensayos inmunoenzimáticos (ELISAs)***

Se utilizaron placas de 96 pozos de alta capacidad de unión (MaxiSorp, Nunc, EUA) y se recubrieron con Ova (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o TT (5 Lf/mL) diluidos en tampón de recubrimiento (TR):  $\text{NaHCO}_3$  35 mM,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  11 mM, pH 9,5. Las placas se incubaron a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 16 h en cámara húmeda. Después de lavar las placas tres veces con solución de lavado (SL): SSTF-Tween-20 0,05%, se procedió al bloqueo de los sitios inespecíficos durante 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$  con 100  $\mu\text{L}/\text{pozo}$  de solución de bloqueo (SB): SSTF-leche descremada (LD) 3% en cámara húmeda. Posteriormente, las placas se lavaron tres veces con SL para luego aplicar las muestras de suero. En todos los casos los sueros se diluyeron 1:100 en SSTF, aplicando 100  $\mu\text{L}/\text{pozo}$  por duplicado.

Después de 2 h de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  las placas se lavaron cuatro veces y se adicionó 100  $\mu\text{L}/\text{pozo}$  de anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Sigma-A9044, EUA), diluido 1:2000 en solución de dilución del conjugado (SC): SL-LD 1%. Las placas con el conjugado fueron incubadas durante 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$  en cámara húmeda y posteriormente, se lavaron cinco veces. Para el revelado de la reacción se adicionaron 100  $\mu\text{L}/\text{pozo}$  de orto-fenilenediamina dihidrocloride (OPD, SigmaFastTM) y se incubaron en la oscuridad durante 30 min. Pasado este tiempo, la reacción se detuvo mediante la adición de 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2,5 M y la densidad óptica (DO) se leyó a 492 nm en un lector de microplacas (Titertek, Multiskan Plus). Los resultados del ELISA se expresaron en DO.

Para determinar la respuesta de IgA anti Ova y anti TT, se siguió la misma metodología descrita anteriormente con los siguientes cambios. Las salivas y las heces se aplicaron sin dilución (ya estaban diluidas 1:2 por la adición del inhibidor de proteasas). La anti IgA de ratón conjugada a peroxidasa (Sigma-A4789, EUA) se empleó a una dilución 1:1000 en SC. Las subclases

de IgG se determinaron por un ELISA amplificado con estreptavidina-biotina. Los pasos de recubrimiento, bloqueo y adición de las muestras se realizaron de igual forma. Se aplicaron 100  $\mu\text{L}/\text{pozo}$  de anti IgG1 o anti IgG2a de ratón biotinilados (Amersham International, Little Chalfont, Reino Unido, F2883) diluidos 1:1000 en SC, durante 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$  en cámara húmeda. Posteriormente, se añadió estreptavidina-peroxidasa (Sigma-E2886, EUA) en una dilución 1:2000 en SC y se incubó 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . A continuación, las placas se lavaron cinco veces y se adicionaron 100  $\mu\text{L}/\text{pozo}$  de OPD y se incubaron en la oscuridad durante 30 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . La DO se leyó a 492 nm en un lector de microplacas (Titertek, Multiskan Plus). Los resultados se expresaron en DO.

Los procedimientos anteriormente descritos se repitieron al menos tres veces.

### **Análisis estadístico**

Para todos los análisis estadísticos realizados se utilizó el paquete de programas GraphPad Prism versión 5.03 (GraphPad Software Inc. 2007). La normalidad de los datos se comprobó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de la varianza mediante la prueba de Barlet. Las diferencias significativas entre las medias se determinaron por la prueba t-Student al comparar dos grupos o el análisis de comparaciones múltiples según la prueba de Tukey, previa comprobación de diferencias entre los grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple. Los datos para los cuales no fue posible un ajuste a una distribución normal, se analizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y las medias se compararon mediante la prueba de Dunns. Las diferencias estadísticas se consideraron significativas para valores de  $p < 0,05$ .

### **Resultados**

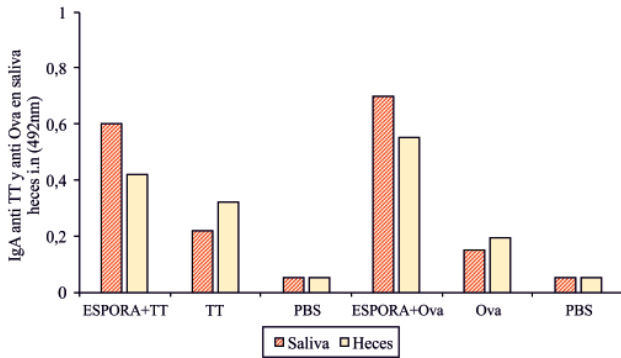
La revisión realizada durante los últimos cinco años evidenció la existencia de 19 trabajos que usan esporas de *B. subtilis* como adyuvante en formulaciones vacunales por diferentes rutas. Predominó su empleo por vía mucosal, particularmente la o.r, sobre la parenteral. Se encontró tres formas para el uso de las esporas: 1) la recombinante, basada en la expresión de antígenos heterólogos en la superficie de la spora, usando plásmidos y fusión genética; 2) la adherencia de antígenos a la superficie de las esporas; 3) la coadministración.

**Tabla 3.** Resultados de revisión bibliográfica del uso de esporas de *B. subtilis* como adyuvante vacunal. 2010-2015.

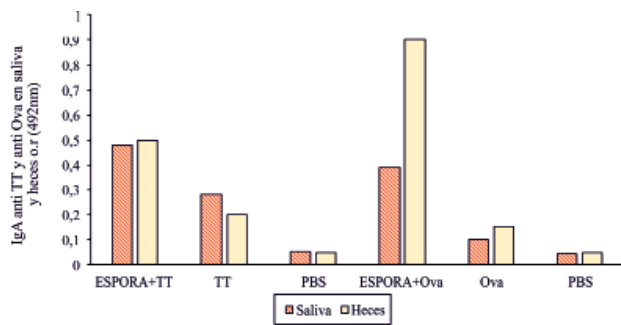
Antígeno	Sistema de expresión	Vía/modelo	Adyuvancia	Ref.
<b>Recombinante</b>				
Enolasa de <i>Clonorchis sinensis</i>	Plásmido	o.r/ratas	Inmunopotenciación IgG sérica e IgA regional anti enolasa	(8)
Leucina aminopeptidasa 2 de <i>Clonorchis sinensis</i>	Fusión de CotC-CsLAP2	i.g/Balb/c	Inmunopotenciación IgG e IgG2a sérica e IgA regional anti Leucina. Inmunopolarización Th1 (IFN- $\gamma$ IL-6, TNF- $\alpha$ y Th17 (IL-17a))	(9, 10)
CTB-FMDV	Plásmido	o.r/curieles	Inmunopotenciación IgG sérica e IgA Inmunopolarización Th1 (IFN- $\gamma$ ) Protección total frente a reto	(11)
Proteína antihelmíntica Cry5B	Plásmido	Hamster	Protección hasta 50% vs dosis letales <i>C. elegans</i> . Reducción de 93% de carga de <i>Ancylostoma ceylanicum</i>	(12)
M2e3 proteína del virus A de la influenza.	Fusión de CotB - M2e3	o.r/ratones	Inmunopotenciación IgG sérica e IgA Protección total frente a desafío letal de virus de la gripe H1N1	(13)
Proteína VP6 de Rotavirus murino	Plásmido en forma esporulada	i.n/ratones Balb/c	Inmunopotenciación IgG sérica e IgA en heces anti VP6. Protección frente al desafío viral y disminución de carga viral en heces	(14)
	Plásmidos en forma vegetativa	i.n/Balb/c	Inmunopotenciación IgG sérica anti VP6	
UreB de <i>Helicobacter acinonychis</i>	<i>Bacillus</i> expresando	o.r/Balb/c	Inmunopolarización Th1 (IFN- $\gamma$ )	(15)
	(CotC-UreB3) coadministrada con esporas que expresan (CotB-linker-IL-2)		Inmunopolarización Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) y Th17 (IL-17a)	(16)
Proteína P1 de <i>Streptococcus mutans</i>	Expresión de adhesinas bacterianas (SlpA, InvA) en CotB y expresión proteína P1	o.r, i.n, s./ Balb/c o Swiss	Aumento de la persistencia de las esporas en TGI. Inmunopotenciación IgG sérica e IgA en saliva	(17)
Proteína MPT64 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Expresión CotB-MPT64 por fusión genética en esporas vivas e inactivadas con formilaldehído	Modelo murino	Reducción de carga bacteriana en pulmones. Inmunopolarización Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ )	(18)

Antígeno	Sistema de expresión	Vía/modelo	Adyuvancia	Ref.
<b>Adsorción de antígenos en la superficie de esporas</b>				
Gliadina	Fusión en cotH y cotE	o.r, i.n/ ratones transgénicos HLA-DQ8.	Inmunopolarización Th1 anti gliadina	(19)
VH5N1 (NIBRG-14 clade1)	Fusión en esporas muerta	i.n/ratones	Inmunopotenciación IgG sérica e IgA anti VH5N1 Inmunopolarización Th1 anti VH5N1 Protección total vs. reto (20 LD (50)) Protección parcial (60%) con dosis única Protección total frente a H5N2 (5 LD (50)) con dosis única de esporas muertas Inmunopotenciación IgG e IgG2a sérica Inmunopolarización Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ )	(20)
<b>Coadministración</b>				
Proteína pgDE7h de HPV-16	Adición y mezcla Esporas vivas y muertas	i.n/C57BL/6 i.m/C57BL/6 con HPV-16 i.p/ C57BL/6	Inmunopolarización Th1 CD8+ específicos Aumento de inmunidad anti tumoral de 80% Activación de CD y migración de células proinflamatorias	(21)
Proteína gag p24 del VIH+ Esporas vivas o inactivadas con calor	Adición y mezcla	s.c/ C57BL/6 y Balb/c	Aumento de moléculas MHC, CD40, y citocinas proinflamatorias por CD, por la vía de señalización TLR2 y MyD88 Inmunopotenciación IgG y subclases Inmunopolarización Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) y CD8+	(22)
Proteína ESAT-6 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Adición y mezcla	s.c/C57BL/6	Inmunopolarización Th1 Aumento en la secreción de citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10). Inmunopotenciación IgG sérica anti ESAT-6	(23)
TTFC (Fragmento C de la Toxina Tetánica, de <i>Clostridium tetani</i> )	Fusión con la proteína CotC. Esporas y célula vegetativa	o.r/murino y curieles i.n, s.l/ murino y curieles	No induce respuesta inmune protectora vs. dosis letales con la toxina tetánica Inmunopotenciación IgG, IgG1 e IgG2a sérica anti TT e IgA en lavado vaginal, heces y saliva Patrón mixto Th1-Th2 (IFN- $\gamma$ e IL-2) Aumento de expresión de MHCII en CD	(7, 24, 25)

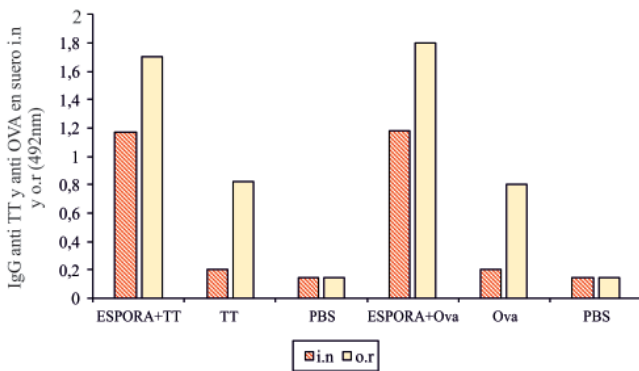
Leyenda: i.n, intranasal, o.r, oral, s.c, subcutánea, i.g, intragástrica, s.l, sublingual, i.m, intramuscular, i.p, intraperitoneal. LTh, Linfocitos T cooperadores (helper). CD, células dendríticas, CT-B, toxina colérica, FMDV, virus de la enfermedad de pie y boca tipo Asia 1, TGI, tracto gastrointestinal, SlpA, proteína S-layer de *Lactobacillus brevis*, InvA proteína invasiva expresada por *Yersinia pseudotuberculosis*



**Fig. 1.** Respuesta mucosa de IgA específicos contra Ova y TT en saliva y heces por la coadministración de esporas de *B. subtilis* por vía i.n. Los resultados se expresan en densidades ópticas.



**Fig. 2.** Respuesta mucosa de IgA específicos contra Ova y TT en saliva y heces por la coadministración de esporas de *B. subtilis* por vía o.r. Los resultados se expresan en densidades ópticas.



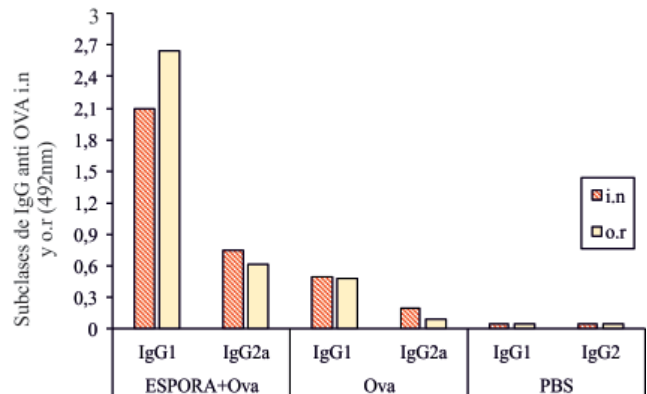
**Fig. 3.** Respuesta sistémica de IgG específicos contra Ova y TT en suero por la coadministración de esporas de *B. subtilis* por vía i.n y o.r. Los resultados se expresan en densidades ópticas.

La más utilizada fue la recombinante y la coadministración fue la menos empleada, al igual que la vía i.n. Los antígenos usados fueron proteínas provenientes de bacterias, virus y helmintos y un reporte con ADN. Por un lado, se evidenciaron respuestas inmunes humorales sistémicas, a nivel de mucosas y celulares específicas superiores, modelos en los que se generaron protección, e incluso inmunidad anti tumoral. Por otro lado, se recogieron evidencias de los mecanismos de adyuvancia por parte de las esporas en relación con la estimulación de la respuesta inmune innata. No se encontraron trabajos en ensayos clínicos sino sólo en fase de experimentación preclínica (Tabla 3).

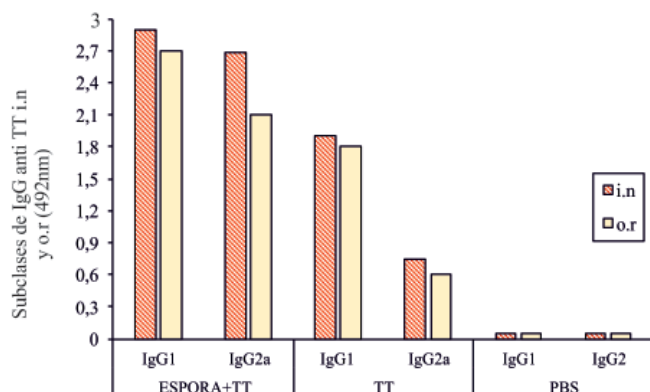
En nuestro trabajo la inmunización i.n u o.r en ratones con esporas de *B. subtilis* coadministrados con Ova o TT con 3 dosis (0, 7 y 14 días) estimularon la producción de anticuerpos de clase IgA anti Ova o anti TT en saliva y en heces, significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) a los grupos controles con solo Ova, TT o PBS (Fig. 1 y 2).

La inmunización i.n y o.r con esporas de *B. subtilis* coadministrados con Ova estimula respuestas sistémicas de IgG, significativamente superiores ( $p < 0,0001$ ) a los grupos inmunizados con sólo Ova o PBS. Similares resultados se obtuvieron cuando se coadministró TT (Fig. 3).

La inmunización por vía i.n y o.r con esporas de *B. subtilis* coadministrados con Ova estimula respuestas sistémicas de subclases de IgG (IgG1 e IgG2a), significativamente superiores ( $p < 0,0001$ ) a los grupos inmunizados con sólo Ova o PBS (Fig. 4). Similar efecto se observó cuando se coadministran con TT como antígeno modelo muy inmunogénico (Fig. 5). Nótese que se están induciendo respuestas de IgG2a específicas solamente al adyuvarse con las esporas.



**Fig. 4.** Respuesta sistémica de subclases de IgG específicos contra Ova en suero por la coadministración de esporas de *B. subtilis* por vía i.n y o.r. Los resultados se expresan en densidades ópticas.



**Fig. 5.** Respuesta sistémica de subclases de IgG específicos contra TT en suero por la coadministración de esporas de *B. subtilis* por vía i.n y o.r. Los resultados se expresan en densidades ópticas.

## Discusión

La revisión realizada permitió identificar la existencia de varias publicaciones que usan las esporas de *B. subtilis* como adyuvante por diferentes vías de administración, siendo la expresión de antígenos recombinantes la más utilizada, así como la vía oral entre la aplicación mucosa. Los experimentos de adyuvación realizados, usando las esporas y Ova o TT coadministrados, demostraron su acción adyuvante tanto por vía o.r como i.n.

La ruta o.r ha sido la más utilizada para inmunización mucosal debido a que involucra protección del tracto gastrointestinal. Esto es debido al tamaño de la superficie gastrointestinal comparado con otros órganos inmunes. Además, la seguridad con que el intestino puede manejar y procesar tóxicos o sustancias más rápido que otros órganos. Por consiguiente, grandes cantidades de antígenos pueden ser administrados por vía o.r con efectos adversos mínimos. Sin embargo, las vacunas orales se enfrentan a un ambiente hostil en donde son diluidas por las secreciones mucosas y degradadas por las enzimas orales y gástricas entre las que se encuentran las proteasas y las nucleasas. También para la inmunización o.r se requieren dosis relativamente grandes de antígenos sin la manera apropiada de determinar la cantidad real que cruza la mucosa o el sitio preciso de inoculación (3).

La inmunización o.r genera pobre respuesta sistémica debido a la absorción limitada y a la degradación del antígeno en el estómago. Vacunas que son capaces de generar una respuesta inmune robusta si se administran por vía parenteral, no son eficaces cuando son administradas oralmente (22) lo que evidencia las altas concentraciones requeridas por la vía oral. Consecuentemente, muy pocas vacunas orales han sido aceptadas para el uso humano. Éstas incluyen la vacuna de la polio, salmonelosis, cólera y rotavirus. (21).

La inmunización o.r también puede conducir al desarrollo de tolerancia oral donde hay supresión activa de la inmunidad sistémica debido a la generación de varios linfocitos T reguladores (Treg). Las Treg producen factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) e IL-10 que inhiben la generación de células T efectoras, liberándose así citocinas no específicas del antígeno, produciendo de esta manera hiporespuesta (24).

Tal y como refiere la literatura revisada, en este trabajo la administración o.r de esporas de *B. subtilis* como adyuvante de la respuesta inmune, produjo respuesta de IgG sistémica significativamente mayor a la inmunización con Ova solamente. Similar respuesta se obtuvo con la coadministración de las esporas con el TT como antígeno muy inmunogénico.

Es necesario puntualizar que las diferencias de respuesta entre Ova y TT se deben a las características estructurales y químicas de ambos antígenos, si bien ambos son de naturaleza proteica, solubles, la Ova es menos compleja estructuralmente; en cuanto al TT está formado por subunidades. Este resultado concuerda con lo reportado en la bibliografía con respecto al uso de Ova como antígeno poco inmunogénico y el TT como antígeno muy inmunogénico (26).

La administración i.n por su parte es una ruta más atractiva que la inmunización o.r, específicamente para los antígenos expresados en la superficie. Por esta ruta se presentan dosis bajas de antígeno directamente al sistema inmunológico nasofaríngeo e inducen respuestas inmunes sistémicas más altas que la ruta o.r. En varios estudios realizados en ratones, monos y humanos, la administración de vacunas i.n induce respuestas mucosas de anticuerpos IgA específicos y linfocitos T citotóxicos en los tractos respiratorios, genitales, gastrointestinales y las glándulas salivales, además de respuesta sistémica (22).

La inmunización i.n con bajas dosis con esporas de *B. subtilis* o las células vegetativas que expresan el fragmento C de la toxina tetánica (TTFC) de forma recombinante, indujeron inmunidad sistémica robusta y consistente, con títulos altos de anticuerpos en el suero, protegiendo contra dosis letales de la toxina tetánica (7).

En este trabajo, la respuesta obtenida de anticuerpos en sueros, luego de la coadministración de las esporas de *B. subtilis* con Ova por vía i.n con respecto al grupo inmunizado con Ova solamente, produjo un aumento de IgG sistémica. Similares resultados fueron obtenidos cuando se coadministró con TT.



Si bien la ruta de inmunización mucosa (i.n u o.r) difiere en el tipo y la calidad de la respuesta, como se comentó anteriormente, así como también la naturaleza, tamaño y complejidad del antígeno (entre otras características), el adyuvante que forma parte de las formulaciones vacunales es fundamental para la potenciación de la respuesta inmune (sobre todo para aquellos antígenos que no estimulan una potente respuesta inmune), tal y como queda evidenciado en nuestros resultados, donde la inmunización con antígenos modelos, coadministrados con las esporas de *B. subtilis* incrementan la respuesta sistémica antígeno específica por ambas vías.

Esto concuerda con la literatura científica, donde se evidencia la capacidad adyuvante de las esporas de *B. subtilis*. En tal sentido, se reporta que cuando se coadministraron dichas esporas (vivas o inactivadas con calor) con proteínas gag p24 del VIH, inducen respuesta celular y de anticuerpos específicos frente a las mismas, en diferentes modelos murinos, utilizando la vía subcutánea (22). De manera similar, se ha demostrado que la inmunización i.n con esporas de *B. subtilis* que expresan la proteína VP6 del rotavirus genera inmunidad protectora sistémica contra el rotavirus en ratones (14). Esto implica la activación de linfocitos Th específicos, capaces de cooperar con los linfocitos B e inducir el cambio de clase de inmunoglobulinas para la producción de anticuerpos IgG. Para la activación de los linfocitos Th, es necesario la presentación de los epítopes de Ova en las moléculas del sistema principal de histocompatibilidad (MHC) de las células presentadoras de antígenos (CPA) en un contexto de señales coestimuladoras adecuadas (6). Por lo que este microambiente pudiera ser propiciado por las esporas.

Para el estímulo eficaz de los linfocitos Th se requiere de una señalización apropiada por las células dendríticas (CD) maduras, como la expresión aumentada de moléculas coestimuladoras, secreción de citocinas y la presentación de péptidos antigénicos por las moléculas del MHC.

El estudio in vitro realizado por de Souza, mostró que las esporas tanto vivas como inactivadas por calor inducen la maduración de las CD, el aumento de citocinas proinflamatorias y moléculas como MHC-I, MHC-II y CD40. Aunque las esporas vivas fueron más eficaces que las inactivadas por calor induciendo la expresión de MHC-II en la superficie, la secreción de IL-12 y el aumento de la activación de CD. Esta activación de las CD puede atribuirse a la germinación de las esporas de *B. subtilis* (8).

Las subclases de anticuerpos IgG2a e IgG1 son usadas como indicadores de la inducción de respuestas Th1 y Th2, respectivamente, así la razón IgG1/IgG2 puede ayudar a definir el fenotipo de linfocitos T inducidos por la vacunación (2).

En tal sentido, mientras que los grupos inmunizados con TT y Ova solos indujeron respuestas dominadas por la subclase de IgG1, los grupos inmunizados por ambas vías a los cuales se les coadministraron las esporas con dichos antígenos produjeron IgG2a específicos, lo cual concuerda con la literatura que el uso de las esporas conlleva a un cambio significativo hacia una respuesta Th1 o un patrón mixto (2, 25). Esto probablemente se deba a que las esporas de *B. subtilis* induzcan una presentación del antígeno directamente en la clase de MHC I (así como la clase II), por varios tipos de CPA incluyendo los linfocitos B, las CD y los macrófagos (25). Sin embargo, en este caso, sería necesario cuantificar los patrones de citocinas características de cada fenotipo de linfocitos Th, aspecto que no fue objetivo de nuestro trabajo.

El análisis en cuanto a la respuesta mucosal inducida desde la perspectiva de las muestras, evidenció una respuesta de IgA anti Ova y anti TT superiores a los controles. Oggioni y cols (27) demostraron una mejora de IgG1, IgG2a (incluyendo IgA cuando se administra i.n) y el aumento de las respuestas de células T CD4+ y CD8+.

Estas respuestas inmunes eran directamente atribuibles a las propiedades adyuvantes conferidas por las esporas de *B. subtilis*. Además, se reporta que la actividad inmunoestimuladora de células bacterianas vivas derivadas de *B. subtilis*, vectores actualmente bajo investigación pudiera ser responsable de tales respuestas (27).

Por otra parte, ratones a los cuales se les administró por vía o.r, sublingual e i.n esporas de *B. subtilis* que expresan de forma recombinante el TTFC, indujeron altos títulos de respuesta sistémica de IgG y mucosal de IgA específicas contra el TTFC, con protección al reto solamente en los grupos inmunizados por vía i.n y s.l (28).

Se concluye que las esporas de *B. subtilis* son excelentes adyuvantes en formulaciones coadministradas con Ova y TT, tal y como se encontró en la revisión bibliográfica realizada, lo que sugiere su gran potencial clínico en futuras vacunas mucosales

## Referencias

1. Negri DR, Riccomi A, Pinto D, Vendetti S, Rossi A, Cicconi R, et al. Persistence of mucosal and systemic immune responses following sublingual immunization. *Vaccine* 2010;28:4175-80.
2. Neutra MR, Kozlowski PA. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:148-58.
3. Cuburu N, Kweon MN, Song JH, Hervouet C, Luci C, Sun JB, et al. Sublingual immunization induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice. *Vaccine* 2007;25:8598-610.
4. Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 2005;11(Suppl):S45–53.
5. O’Hagan DT, Valiente NM. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:727-35
6. Pérez O, Lastre M, Cabrera O, del Campo J, Bracho G, Cuello M, et al. New vaccines require potent adjuvants like AFPL1 and AFCo1. *Scand J Immunol* 2007;66:271-77
7. Lee S, Belitsky BR, Brown DW, Brinker JP, Kerstein KO, Herrmann JE, et al. Efficacy, heat stability and safety of intranasally administered *Bacillus subtilis* spore or vegetative cell vaccines expressing tetanus toxin fragment C. *Vaccine* 2010;28:6658-65.
8. Yu J, Chen T, Xie Z, Liang P, Qu H, Shang M, et al. Oral delivery of *Bacillus subtilis* spore expressing enolase of *Clonorchis sinensis* in rat model: induce systemic and local mucosal immune responses and has no side effect on liver function. *Parasitol Res* 2015;114:2499-505.
9. Qu H, Xu Y, Sun H, Lin J, Yu J, Tang Z, et al. Systemic and local mucosal immune responses induced by orally delivered *Bacillus subtilis* spore expressing leucine aminopeptidase 2 of *Clonorchis sinensis*. *Parasitol Res* 2014;113:3095-103.
10. Wang X, Chen W, Tian Y, Mao Q, Lu X, Shang M, et al. Surface display of *Clonorchis sinensis* enolase on *Bacillus subtilis* spores potentializes an oral vaccine candidate. *Vaccine* 2014;32:1338-45.
11. Hu B, Li C, Lu H, Zhu Z, Du S, Ye M, et al. Immune responses to the oral administration of recombinant *Bacillus subtilis* expressing multi-epitopes of foot-and-mouth disease virus and a cholera toxin B subunit. *J Virol Methods* 2011;171(1):272-9.
12. Hu Y, Miller MM, Derman AI, Ellis BJ, Monnerat RG, Pogliano J, et al. *Bacillus subtilis* Strain Engineered for Treatment of Soil-Transmitted Helminth Diseases. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:5527–32.
13. Zhao G, Miao Y, Guo Y, Qiu H, Sun S, Kou Z, et al. Development of a heat-stable and orally delivered recombinant M2e-expressing *B. subtilis* spore-based influenza vaccine. *Hum Vaccin Immunother* 2014;10:3649-58.
14. Lee S, Belitsky BR, Brinker JP, Kerstein KO, Brown DW, Clements JD, et al. Development of a *Bacillus subtilis*-based rotavirus vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:1647–55.
15. Hinc K, Stasiłojć M, Piątek I, Peszyńska-Sularz G, Iścicato R, Ricca E, et al. Mucosal Adjuvant Activity of IL-2 Presenting Spores of *Bacillus subtilis* in a Murine Model of *Helicobacter pylori* Vaccination. *PLoS One* 2014;9(4):e95187.
16. Stasiłojć M, Hinc K, Peszyńska-Sularz G, Obuchowski M, Iwanicki A. Recombinant *Bacillus subtilis* Spores Elicit Th1/Th17-Polarized Immune Response in a Murine Model of *Helicobacter pylori* Vaccination. *Mol Biotechnol* 2015;57:685-91.
17. Tavares Batista M, De Souza RD, Paccetz J, Ewerton Ferreira BL, Cavalcante RCM, Ferreira RCC, et al. Gut Adhesive *Bacillus subtilis* Spores as a Platform for Mucosal Delivery of Antigens. *Infection and Immunity* 2014;82:1414–23.
18. Sibley L, Reljic R, Radford DS, Huang JM, Hong HA, Cranenburgh RM, et al. Recombinant *Bacillus subtilis* spores expressing MPT64 evaluated as a vaccine against tuberculosis in the murine model. *FEMS Microbiol Lett* 2014;358(2):170-9.
19. Bonavita R, Iścicato R, Maurano F, Ricca E, Rossi M. Mucosal immunity induced by gliadin-presenting spores of *Bacillus subtilis* in HLA-DQ8-transgenic mice. *Immunol Lett* 2015;65(2):84-9.
20. Song M, Hong HA, Huang JM, Colenutt C, Khang DD, Nguyen TV, et al. Killed *Bacillus subtilis* spores as a mucosal adjuvant for an H5N1 vaccine. *Vaccine* 2012;30:3266-77.
21. Aps LR, Diniz MO, Porchia BF, Sales NS, Moreno AC, Ferreira LC. *Bacillus subtilis* spores as adjuvants for DNA vaccines. *Vaccine* 2015;33:2328-34.
22. de Souza RD, Batista MT, Luiz WB, Cavalcante RC, Amorim JH, Bizerra RS, et al. *Bacillus subtilis* Spores as Vaccine Adjuvants: Further Insights into the Mechanisms of Action. *PLoS ONE* 2014;9(1):e87454.
23. Esparza-Gonzalez SC, Troy AR, Izzo AA. Comparative Analysis of *Bacillus subtilis* Spores and Monophosphoryl Lipid A as Adjuvants of Protein-Based Mycobacterium tuberculosis-Based Vaccines: Partial Requirement for Interleukin-17A for Induction of Protective Immunity. *Clinical and Vaccine Immunology* 2014;21:501-8.
24. Amuguni JH, Lee S, Kerstein KO, Brown DW, Belitsky BR, Herrmann JE, et al. Sublingually administered *Bacillus subtilis* cells expressing tetanus toxin C fragment induce protective systemic and mucosal antibodies against tetanus toxin in mice. *Vaccine* 2011;29:4778-84.
25. Amuguni H, Lee S, Kerstein KO, Brown DW, Belitsky BR, Herrmann JE, et al. Sublingual immunization with an engineered *Bacillus subtilis* strain expressing tetanus toxin fragment C induces systemic and mucosal immune responses in piglets. *Microbes Infect* 2012;14:447-56.

26. Miyaji EN, Carvalho E, Oliveira ML, Raw I, Ho PL Trends in adjuvant development for vaccines: DAMPs and PAMPs as potential new adjuvants. *Braz J Med Biol Res* 2011;44:500-13.
27. Oggioni MR, Ciabattini A, Cuppone AM, Pozzi G. *Bacillus* spores for vaccine delivery. *Vaccine* 2003;21(Suppl 2):S96-101.
28. Mauriello EMF, Duc LH, Istatico R, Cangiano G, Hong HA, De Felice M, et al. Display of heterologous antigens on the *Bacillus subtilis* spore coat using CotC as a fusion partner. *Vaccine* 2004;22:1177-87

---

## Activity adjuvant of *Bacillus subtilis* spores for mucosal route

### Abstract

*Bacillus subtilis* spores generally considered safe, have received growing attention due to their potential biotechnological applications including vaccine formulations, particularly as vaccine adjuvants. In the present review we present the status of the adjuvanticity of the spore *B. subtilis* for mucosal route and our experience regarding its adjuvant activity induced against two model antigens, Tetanus Toxoid (TT) and ovalbumin (Ova) for oral (o.r) and intranasal (i.n) immunization. A document review on *B. subtilis*, adjuvant, vaccine and mucosal route was carried out in MEDLINE by PubMed, SciELO and LILACS databases. *B. subtilis* spores (RG 4365) were used for the exploration of the adjuvant activity. Balb/c mice were immunized by i.n and o.r route with TT or Ova combined with *B. subtilis* spores and specific antibody response in serum, saliva and fecal were measured by ELISA. This review showed the existence of several papers using *B. subtilis* spores as adjuvant by different methodologies and administration routes, being the expression of recombinant antigens and the the o.r route the most widely used. In our work we found an increase of seric response of IgG, subclass IgG1 and IgG2a and specific IgA in saliva and feces in groups immunized with spores coadministered with Ova and TT by both routes, which was significantly superior to control groups ( $p < 0.05$ ). These data suggest that spores are an efficient mucosal and systemic adjuvant for enhancing humoral immune responses and highlight their clinical potential for future mucosal vaccines.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, adjuvants, vaccine, mucosal route.

---

Recibido: Octubre de 2015

Aceptado: Diciembre de 2015