

ESPOROS DE *BACILLUS SUBTILIS* COMO PLATAFORMA VACINAL CONTRA ENTEROPATIA PROLIFERATIVA

CAMILA DIAS DE AGUIAR¹; NEIDA LUCIA CONRAD²; FRANCISCO DENIS SOUZA SANTOS²; GUSTAVO RETZLAF MASS², RENAN ARAÚJO PIRAINÉ², FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE³

¹Universidade Federal de Pelotas – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
camiladaguiar1196@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia -
conradneida@gmail.com; denis.santos195@gmail.com; renanbiotec@gmail.com;
gustavo.retzlaf@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
fleivasleite@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas estratégias de vacinação é de grande importância para aprimorar a resposta imune a nível de mucosas, oferecer maior segurança e reduzir os efeitos colaterais (DUC et al., 2003). Ao longo dos anos, sistemas de apresentação de antígenos em distintas plataformas vêm sendo estudado, como, células eucarióticas, procarióticas, partículas sintéticas e esporos bacterianos, a fim de melhorar a imunogenicidade de antígenos vacinais, especialmente recombinantes (DE ALMEIDA, 2022). Células de *Lactobacillus* spp. (SCHEPPLER et al., 2002), bem como esporos de *Bacillus subtilis* (ISTICATO e RICCA, 2016), tem sido proposto como uma promissora plataforma vacinal.

Bacillus subtilis é um bacilo Gram-positivo, não patogênico com propriedades probióticas e que, quando exposto a condições de escassez nutricional, produz esporos (WANG et al., 2017). Os esporos de *B. subtilis* são extremamente resistentes à radiação ultravioleta, produtos químicos, extremos de temperatura e pH, podendo sobreviver por longos períodos em tais situações (SETLOW, 2006). Além da estabilidade e facilidade de manipulação, apresentam a capacidade de interagir com células do sistema imune modulando respostas imunes (CUTTING et al., 2009). Devido a estrutura peculiar do esporo, seu uso como veículo de entrega de antígenos em sua superfície é preconizado (ISTICATO e RICCA, 2016).

Enteropatia proliferativa (EP), causada pela bactéria intracelular obrigatória *Lawsonia intracellularis*, é uma doença infectocontagiosa entérica, com distribuição mundial que afeta principalmente suínos e outras espécies, causando significativas perdas econômicas (DE SOUZA, 2021). As vacinas disponíveis contra EP apresentam limitações quanto à proteção e imunidade esterilizante, tornando necessário o desenvolvimento de novas vacinas ou estratégias vacinais (GUEDES, 2008).

O presente projeto propõe avaliar a utilização de esporos de *Bacillus subtilis* como plataforma de apresentação de antígeno recombinante de *L. intracellularis* no desenvolvimento de uma vacina contra Enteropatia Proliferativa.

2. METODOLOGIA

Cultivo de esporos

Bacillus subtilis, linhagem AZ54, utilizada neste experimento pertence à coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia do Núcleo de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). O microrganismo foi semeado em meio Luria Bertani (LB), incubado a 37 °C durante 18 horas. Após o crescimento de colônias isoladas, 1 colônia foi inoculada em 25 ml de meio LB e incubados em agitador orbital à 100 rpm, por 18 horas. Os cultivos serviram de inóculo para 1L de meio NYSM (0,25g de peptona, 0,25g de extrato de carne, 0,05g de extrato de levedura e 0,05g de fosfato de potássio monobásico), mantido sob agitação a 100rpm e a temperatura à 37 °C durante 72 horas. Ao final das 72 horas, o cultivo foi centrifugado, a 7000 g durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante descartado e o *pellet* submetido a duas lavagens com água estéril fria (4 °C) e uma lavagem em 20 ml de KCl 1M, respectivamente. Posteriormente, o precipitado foi suspendido em lisozima diluída em 5 ml de Tris HCl (pH 7,0) e incubado por 30 minutos a 37 °C. Os esporos foram lavados com a solução contendo NaCl 1M, água esterilizada fria e SDS (Dodecilsulfato de sódio) 0,05%, finalizando com 3 lavagens com água esterilizada fria. Depois de purificados, os esporos foram armazenados em água destilada à -20 °C.

Para a determinação do rendimento dos esporos, foi utilizado o método de turbidimetria.

Antígeno modelo

Como antígeno modelo para a adsorção, utilizou-se uma proteína recombinante de *L. intracellularis*, denominada rLiTT.

Adsorção nos esporos

Suspensões com 2×10^9 de esporos foram lavados com 200 μ l de tampão de ligação (citrato de sódio 50mM, pH 4,0). A proteína recombinante purificada (2 μ g, 4 μ g e 8 μ g) foi adicionada à suspensão e incubada em agitação à temperatura ambiente (25 °C) por 1 hora. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada à 10000 g, em temperatura ambiente, por 5 minutos, seguida de duas lavagens com o tampão anteriormente usado (SANTOS et al., 2020).

Para avaliar o processo de adsorção do antígeno no esporo foi realizado eletroforese em SDS Page 15%. As amostras foram adicionadas de tampão de amostra (1:1) e submetidas a tratamento térmico (100 °C por 10 min). Como controle positivo foi utilizada a proteína recombinante purificada e como controle negativo os esporos não adsorvidos ao antígeno. A visualização do perfil proteico foi viabilizada pela coloração do gel com Comassie Blue.

Posteriormente, para confirmar a exposição de rLiTT na superfície do esporo foi realizado um *Western blot*. Para isso, após eletroforese em gel de poliacrilamida 15% as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência a membrana foi bloqueada com 5% de leite em pó durante 1 hora, em agitação, temperatura ambiente. A membrana foi incubada com anticorpo anti-histidina (durante 1 hora, em agitação) e em seguida o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com peroxidase (durante 1

hora, em agitação). A revelação foi realizada utilizando o cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidine).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica empregada para a adsorção da proteína rLiTT em esporos de *B. subtilis* foi eficiente, sendo que as diferentes concentrações (2 μ g-8 μ g) foram adsorvidas, visualizadas através de SDS-PAGE (Figura 1A). A adsorção foi confirmada através de *Western blot*, onde o anticorpo monoclonal anti-histidina reconheceu a proteína recombinante adsorvida nos esporos, sendo possível observar uma banda de aproximadamente 18 kDa, correspondente a massa molecular da proteína rLiTT (Figura 1B).

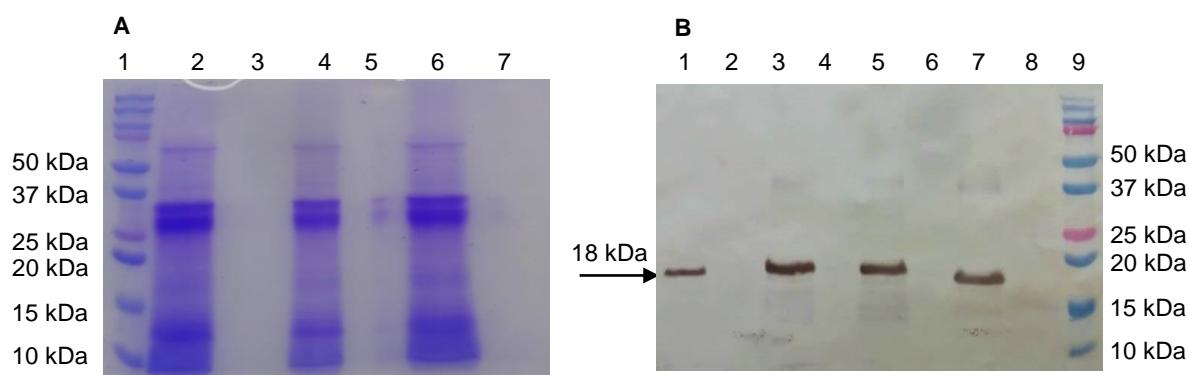


Figura 1. Adsorção da proteína recombinante LiTT em esporos de *B. subtilis*. **A. SDS PAGE em gel de poliacrilamida 15%.** 1 – Marcador, 2 – Esporos adsorvidos com 2 μ g de rLiTT, 3 – Sobre-nadante da adsorção de 2 μ g, 4 – Esporos adsorvidos com 4 μ g de rLiTT, 5 – Sobre-nadante da adsorção de 4 μ g, 6 – Esporos adsorvidos com 8 μ g de rLiTT, 7 – Sobre-nadante da adsorção de 8 μ g **B. Western blot.** Seta – Indicação do tamanho da proteína: 18kDa. 1 - Esporos adsorvidos com 2 μ g de rLiTT, 2 – Sobre-nadante da adsorção de 2 μ g, 3 – Esporos adsorvidos com 4 μ g de rLiTT, 4 - Sobre-nadante da adsorção de 4 μ g, 5 – Esporos adsorvidos com 8 μ g de rLiTT, 6 – Sobre-nadante da adsorção de 8 μ g, 7 – Controle positivo (proteína purificada na concentração de 2 μ g), 8 – Controle negativo (esporos não adsorvidos, na concentração de 2 μ g) e 9 – Marcador.

Em um estudo anterior esporos de *B. subtilis* mostraram-se capazes de adsorver a subunidade da toxina termolábil (LTB) de *E. coli* na concentração de 2 μ g (ISTICATO et al., 2013). Avaliamos esporos de *B. subtilis*, utilizando como ponto de referência a mesma dosagem de esporos (2×10^9) e iniciando com a mesma quantidade de antígeno (2 μ g) usada no trabalho citado, também dobrando a concentração de antígenos (4 μ g e 8 μ g) para a possibilidade de verificar o potencial máximo de adsorção nos esporos.

Posteriormente, a imunogenicidade do complexo esporo-antígeno será avaliada no modelo experimental camundongo (Balb/c).

4. CONCLUSÕES

A metodologia empregada para a adsorção da proteína recombinante LiTT em esporos de *B. subtilis* foi eficiente, demonstrando o potencial da estratégia para entrega de抗ígenos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SANTOS, Francisco Denis S. et al. A probiotic treatment increases the immune response induced by the nasal delivery of spore-adsorbed TTFC. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2020.
2. ISTICATO, Rachele; RICCA, Ezio. Spore surface display. **The Bacterial Spore: From Molecules to Systems**, p. 349-366, 2016.
3. SCHEPPLER, Lorenz et al. Recombinant *Lactobacillus johnsonii* as a mucosal vaccine delivery vehicle. **Vaccine**, v. 20, n. 23-24, p. 2913-2920, 2002.
4. WANG, H. et al. Recent progress in *Bacillus subtilis* spore-surface display: concept, progress, and future. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.101(3), p. 933- 949, 2017.
5. SETLOW, Peter. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 3, p. 514-525, 2006.
6. GUEDES, Roberto Maurício Carvalho. Infecção por *Lawsonia intracellularis*: um problema recorrente na suinocultura do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, n. 1, p. s77-s80, 2008.
7. CUTTING, Simon M. et al. Oral vaccine delivery by probiotics from recombinant spores. **International Reviews of Immunology**, 2009, 28:487-505.
8. DE SOUZA, Rafaela Pinto et al. Enteropatógenos associados a enterocolite em potros: Aspectos epidemiológicos, clínicos e métodos de diagnóstico. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e14710414008-e14710414008, 2021.
9. DUC, Le H. et al. Bacterial spores as vaccine vehicles. **Infection and immunity**, v. 71, n. 5, p. 2810-2818, 2003.
10. DE ALMEIDA, Maria Edilene M. et al. *Bacillus subtilis* spores as delivery system for nasal *Plasmodium falciparum* circumsporozoite surface protein immunization in a murine model. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1-8, 2022.
11. ISTICATO, Rachele 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. 1-11, 2013.