

## ANTIGENICIDADE DE ANTÍGENO DE *LAWSONIA INTRACELLULARIS* ADSORVIDOS EM ESPOROS DE *BACILLUS SUBTILIS*

CAMILA DIAS DE AGUIAR<sup>1</sup>; NEIDA LUCIA CONRAD<sup>2</sup>; FRANCISCO DENIS SOUZA SANTOS<sup>2</sup>; VITÓRIA SEQUEIRA GONÇALVES<sup>2</sup>; NATÁLIA SILVA PERES<sup>2</sup>; FÁBIO PEREIRA LEITES<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - conradneida@gmail.com; denis.santos195@gmail.com; vitoriasgon@gmail.com; nataliaapeeres@outlook.com

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

### 1. INTRODUÇÃO

Diferentes tipos de vacinas são projetados para ativar o sistema imunológico de maneiras distintas e proteger contra uma variedade de doenças (KROLL et al., 2005). As vacinas de subunidade, contém apenas partes específicas do microrganismo, geralmente proteínas, em vez do organismo completo (FOURIE et al., 2021). As vacinas de subunidade têm várias vantagens, incluindo segurança, especificidade, redução de efeitos colaterais, estabilidade e combinação de抗ígenos (SKWARCZYNSKI; TOTH, 2021). Porém, como é constituída apenas de partes do patógeno, requerem a presença de um adjuvante para compor sua fórmula e garantir sua eficácia na resposta imunológica (WANG et al., 2016).

*Bacillus subtilis* é uma bactéria Gram-positiva amplamente utilizada em pesquisas como um adjuvante vacinal (CUTTING et al., 2009). Isso se deve à capacidade de interagir com o sistema imunológico, estimulando a ativação de células imunes e apresentando抗ígenos (WANG et al., 2017). Os esporos de *Bacillus subtilis* possuem características que o torna promissor como plataforma de entrega de抗ígeno vacinal, como por exemplo, resistência a condições adversas como calor e pH ácido (CUTTING et al., 2009). Desta forma, os tornando ideais para carregar os抗ígenos até a mucosa alvo e induzir uma resposta imunológica desejada (ISTICATO e RICCA, 2016).

A Enteropatia Proliferativa Suína (EPS) é uma doença gastrointestinal que afeta suíños, causada pela bactéria *Lawsonia intracellularis*. A EPS é uma doença crônica que acomete o intestino delgado e grosso dos suíños, resultando em perda de peso, diminuição do crescimento, menor conversão alimentar e, em casos graves, mortalidade, prejudicando economicamente o setor de suinocultura (DE SOUZA, 2021).

O presente trabalho propõe avaliar a antigenicidade de um抗ígeno recombinante de *Lawsonia intracellularis* adsorvido em esporos de *Bacillus subtilis* frente ao soro de animais naturalmente infectados.

### 2. METODOLOGIA

#### Adsorção da proteína aos esporos de *Bacillus subtilis*

Suspensões com  $2 \times 10^9/\text{ml}$  esporos foram centrifugados e suspensos em  $200\mu\text{l}$  de tampão de ligação (citrato de sódio 50mM, pH 4,0). A proteína recombinante purificada (3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) foi adicionada à suspensão de esporos e incubada em agitação à temperatura de 25 °C por 1 hora. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada à 10.000 g, em temperatura ambiente, por 5 minutos, seguida de duas lavagens com o tampão anteriormente usado (SANTOS et al., 2020).

### Avaliação da adsorção

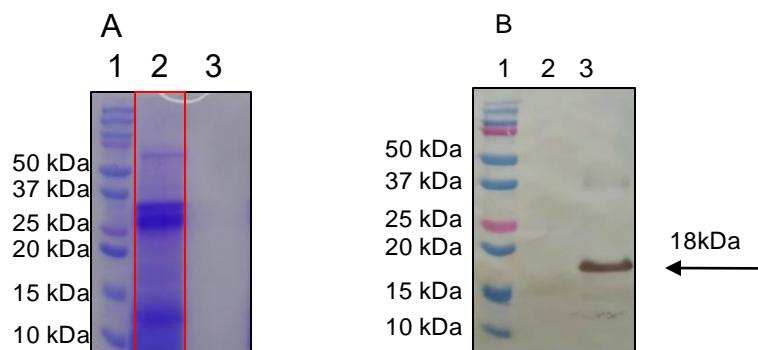
Para avaliar o processo de adsorção do antígeno no esporo foi realizado eletroforese em SDS-PAGE 15%. Foram utilizadas amostras do *pellet* da adsorção e do sobrenadante da adsorção. As amostras foram adicionadas de tampão de amostra (1:1) e submetidas a tratamento térmico (100 °C por 10 min). A visualização do perfil proteico foi viabilizada pela coloração do gel com *Comassié Blue*. Posteriormente, para confirmar a exposição de proteína 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).

### Caracterização com soro suíno

Para a caracterização com o soro suíno, foi realizado eletroforese em SDS Page 15%, conforme descrito anteriormente. Posteriormente, realizou-se o *Western Blot*, utilizando soros de suínos naturalmente infectados por *Lawsonia intracellularis* e anticorpo anti-suíno conjugado.

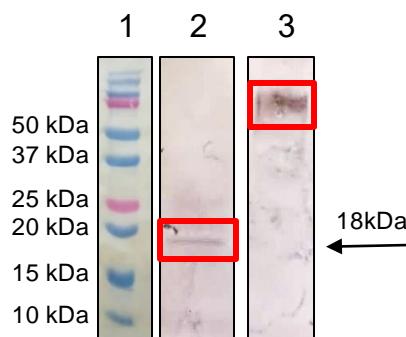
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio do SDS-PAGE (Figura 1A), onde na coluna 2 é possível visualizar as bandas da adsorção completa, enquanto que na coluna 3, onde usou-se o sobrenadante, não há bandas, confirmando a eficiência da técnica empregada. No *Western Blot*, é possível visualizar uma banda de aproximadamente 18 kDa, correspondente a massa molecular da proteína em estudo (Figura 1B), confirmando o reconhecimento pelo anticorpo monoclonal anti-histidina.



**Figura 1. Adsorção da proteína recombinante em esporos de *B. subtilis*.** A. SDS PAGE em gel de poliacrilamida 15%. 1 – Marcadores, 2 – Adsorção com  $2 \times 10^9$  de esporos e 3 $\mu$ g de proteína e 3 – Sobrenadante da adsorção. B. *Western blot*. 1 – Marcadores, 2 - Sobrenadante da adsorção e 3 – Adsorção com  $2 \times 10^9$  de esporos e 3 $\mu$ g de proteína. Seta – Indicação da banda e tamanho da proteína: 18kDa.

Os soros de suínos positivos para *L. intracellularis* foram capazes de reconhecer a proteína recombinante adsorvida nos esporos, visualizando-se a banda de 18kDa, característica da proteína recombinante (Figura 2A) e uma a banda de aproximadamente 50 kDa representando o complexo esporo-proteína (Figura 2B).



**Figura 2. Western Blot.** Os dados representam a caracterização da proteína recombinante adsorvida nos esporos por soro de suínos naturalmente infectado por *L. intracellularis*. 1 –Marcadores, 2- Proteína purificada (3 $\mu$ g), 3 - Adsorção com  $2 \times 10^9$  de esporos e 3 $\mu$ g de proteína. Seta – Indica a proteína 18kDa.

O complexo esporo-proteína recombinante foi reconhecido pelos soros dos suínos infectados, comprovando sua propriedade de antigenicidade, ou seja, além de manter a proteína estável, a adsorção possui potencial para ser reconhecida pelo sistema imune.

#### 4. CONCLUSÕES

A adsorção da proteína recombinante em esporos de *Bacillus subtilis* foi reconhecida por soro de suíno naturalmente infectado com *Lawsonia intracellularis*. Dessa forma, acredita-se que a metodologia utilizada é promissora para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra Enteropatia proliferativa.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SANTOS, F. D. S., MAZZOLI, A., MAIA, A. R., SAGGESE, A., ISTICATO, R., LEITE, F., & BACCIGALUPI, L. **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.
- ISTICATO, R.; RICCA, E. **Spore surface display.** The Bacterial Spore: From Molecules to Systems, p. 349-366, 2016.
- WANG, H.; WANG, Y.; YANG, R. **Recent progress in *Bacillus subtilis* spore-surface display: concept, progress, and future.** Applied microbiology and biotechnology, v. 101, p. 933-949, 2017.
- CUTTING, S. M., HONG, H. A., BACCIGALUPI, L., & RICCA, E. **Oral vaccine delivery by recombinant spore probiotics.** International reviews of immunology, v. 28, n. 6, p. 487-505, 2009.
- DE SOUZA, R. P., MOUSQUER, M. A., MÜLLER, V., da ROSA CURCIO, B., & NOGUEIRA, C. E. W. **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.
- ISTICATO, R., SIREC, T., TREPPICCIONE, 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*.** Microbial Cell Factories, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2013.
- FOURIE, K. R., CHOUDHARY, P., NG, S. H., OBRADOVIC, M., BROWNIE, R., ANAND, S. K., & WILSON, H. L. **Evaluation of immunogenicity and protection mediated by *Lawsonia intracellularis* subunit vaccines.** Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 237, p. 110256, 2021.
- SKWARCZYNSKI, M.; TOTH, I. **Non-invasive mucosal vaccine delivery: Advantages, challenges and the future.** Expert Opinion on Drug Delivery, v. 17, n. 4, p. 435-437, 2020.
- WANG, M.; JIANG, S.; WANG, Y. **Recent advances in the production of recombinant subunit vaccines in *Pichia pastoris*.** Bioengineered, v. 7, n. 3, p. 155-165, 2016.
- KROLL, J. J., ROOF, M. B., HOFFMAN, L. J., DICKSON, J. S., & HARRIS, D. H. **Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by *Lawsonia intracellularis*.** Animal Health Research Reviews, v. 6, n. 2, p. 173-197, 2005.