

## ***Bacillus toyonensis* AMPLIFICA A RESPOSTA IMUNE DE UMA VACINA EXPERIMENTAL CONTRA *Lawsonia intracellularis* EM EQUINOS**

**CAROLINA PELLIZZER DI GIACOMO**<sup>1</sup>; **ANA VITÓRIA COSTA**<sup>2</sup>; **NEIDA LUCIA CONRAD**<sup>3</sup>; **VITÓRIA SEQUEIRA GONÇALVES ZORZI**<sup>4</sup>; **LEONARDO BRASIL FIGUEIREDO**<sup>5</sup>; **FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE**<sup>6</sup>

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas – carolinapdigiacomo@gmail.com*

<sup>2</sup>*Universidade Federal de Pelotas – anavitoriacost4@gmail.com*

<sup>3</sup>*Universidade Federal de Pelotas – conradneida@gmail.com*

<sup>4</sup>*Universidade Federal de Pelotas – vitoriasgon@gmail.com*

<sup>5</sup>*Universidade Federal de Pelotas – leonardo.brasil.08@gmail.com*

<sup>6</sup>*Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com*

### **1. INTRODUÇÃO**

A Equinocultura é um importante setor do agronegócio visto que, segundo a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), movimenta R\$ 30 bilhões por ano e possui a ocupação direta de cerca 640 mil pessoas (Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo, Esalq/SP). O Brasil possui o 4º maior rebanho do mundo, com aproximadamente 5,8 milhões de animais, e o estado do Rio Grande do Sul possui rebanho de equinos de aproximadamente 500 mil animais (IBGE,2022).

*Lawsonia intracellularis* é o microrganismo responsável pela Enteropatia Proliferativa (EP) em equinos (COOPER & GEBHART, 1998). É uma bactéria Gram negativa intracelular obrigatória que foi inicialmente caracterizada em suínos, mas também tem sido relatada com frequência em rebanhos equinos (COOPER & GEBHART, 1998). Os principais sintomas descritos são diminuição nos níveis de reprodução, anemia, febre, diarreia e perda de peso, podendo levar o animal à óbito (PAGE *et al.*, 2012). A prevalência e os impactos econômicos da EP nos rebanhos equinos podem ser subestimados, uma vez que os animais podem apresentar sintomas variados ou ser assintomáticos, dificultando o diagnóstico (JIMÉNEZ *et al.*, 2018). A melhor medida profilática contra o agente etiológico da EP é a vacinação, contudo não há vacinas comerciais destinadas a equinos (VISSCHER *et al.*, 2018). Os抗ígenos podem ser previamente selecionados através de vacinologia reversa e expressos na forma de recombinantes capazes de proteger contra diferentes doenças (FERREIRA *et al.*, 2016). A utilização de vacinas recombinantes vem sendo apresentada como uma potencial estratégia vacinal, podendo superar as limitações das vacinas comercialmente disponíveis.

A adição de adjuvantes e a suplementação com probióticos, como o toxoide tetânico (TT) e *Bacillus toyonensis*, pode aumentar a imunogenicidade do抗ígeno vacinal (ABREU *et al.*, 2024). A suplementação de equinos com microrganismos probióticos foi capaz de aumentar o crescimento e ganho de peso dos animais, além de reduzir a incidência de diarreia (TANABE *et al.*, 2014). A resposta imune estimulada por probióticos inclui a proliferação de células do sistema imune, aumento da produção de anticorpos, aumento da atividade de fagócitos e da indução de expressão de citocinas específicas (SANTOS *et al.*, 2018). *Bacillus toyonensis* exerce efeito imunomodulador em diversas espécies, como camundongos, aves, bovinos e equinos, sendo capaz de aprimorar a eficácia de vacinas através da modulação da resposta imune (ROOS *et al.*, 2010), aumentando os níveis de IgG específicas totais

(SANTOS *et al.*, 2018). Desta forma, este projeto visou avaliar a resposta imune de equinos vacinados com uma vacina experimental da proteína recombinante de *L. intracellularis* fusionada à partícula adjuvante do epítopo T-helper derivado do toxoide tetânico (TT-Th) e o efeito da suplementação de *B. toyonensis* na imunogenicidade da vacina experimental.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Obtenção do antígeno recombinante

O epítopo alvo para o desenvolvimento da vacina foi previamente selecionado através de estudos de vacinologia reversa. A sequência selecionada foi sintetizada comercialmente e inserida no vetor pET28a. As células de *Escherichia coli* foram transformadas com o plasmídeo por choque térmico e a expressão da proteína foi realizada conforme descrito por SAMBROOK & RUSSEL (2012). A expressão de rLiTT foi verificada através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15% e *Western blot* utilizando anticorpo anti-histidina. A purificação e quantificação da proteína foram realizadas utilizando, respectivamente, coluna de cromatografia de afinidade ao níquel e Ensaio de Bradford, com base na curva de albumina do soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich).

### 2.2 Vacinação e suplementação de equinos

Todos os procedimentos realizados estão de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEA 6729-2021).

O cultivo de *B. toyonensis* (cepa BCT-7112) foi realizado conforme SANTOS *et al.*, (2018). Foram utilizados 10 equinos, machos e fêmeas adultos de raça não definida, separados em 2 grupos de forma aleatória, com o grupo suplementado (VS) contendo 6 animais, e o grupo não suplementado (V) com 4 animais. Os animais foram vacinados com a vacina experimental constituída da proteína recombinante rLiTT purificada (400µg/dose) adsorvida no adjuvante Hidróxido de Alumínio (10%) (Sigma-Aldrich), em volume total de 2 ml via intramuscular. A vacinação ocorreu nos dias 0 e 21 do experimento. Os animais suplementados receberam o probiótico de maneira contínua durante 42 dias. A suplementação foi iniciada 7 dias antes da aplicação da primeira dose vacinal, para adaptação alimentícia dos animais. A quantidade do probiótico fornecido diariamente aos animais foi de  $4 \times 10^9$  unidades formadoras de colônia (UFC) de esporos de *B. toyonensis* adicionado ao melaço como veículo (ALIMEL- Supra®-Lote158613, pH ~6,0) na proporção de 3:1 para melhor solubilidade de palatabilidade. A solução probiótico-melado (40 ml) foi adicionado a 500 g de ração comercial e ofertado individualmente aos animais no coxo.

O soro dos animais foi obtido através de coletas de sangue a partir de punção da veia jugular, nos dias -7, 0, 14, 21, 28 e 35. As amostras identificadas e armazenadas a -20 °C até o momento de análise sorológica através de ELISA indireto.

### 2.3 Análise dos sub-isotipos de IgG

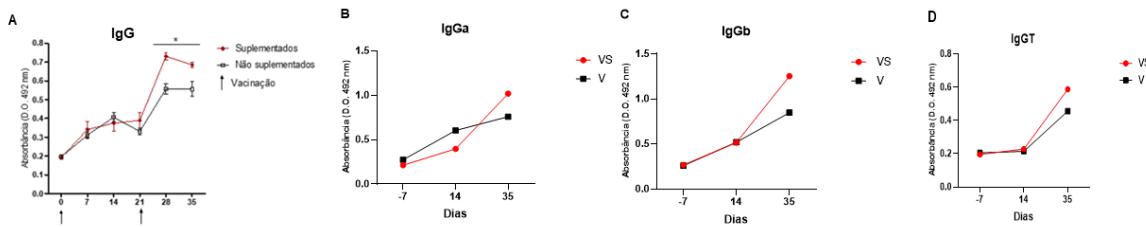
Para a análise dos sub-isotipos de IgG, foi utilizado o método de ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando placas de 96 cavidades revestidas com 100 ng/cavidade de rLiTT. Após incubação com antígeno em tampão carbonato

bicarbonato (pH 8,0), os soros diluídos (1:100) em tampão fosfato-salino (PBS) foram aplicados em triplicata. Um kit da Bio-Rad foi usado para detectar os sub-isotipos. As placas foram lavadas, e uma solução reveladora foi adicionada e incubada por 15 minutos. A reação foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N, e as absorbâncias foram medidas a 492 nm.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os níveis de anticorpos de IgG total específicos anti- rLiTT e sub-isotipos de IgG foram avaliados através de ELISA indireto. Os níveis séricos de IgG total aumentaram significativamente ( $p<0,05$ ) no dia 7. No dia 28, os animais suplementados apresentaram níveis mais altos que os não suplementados ( $p<0,0001$ ), o que se repetiu no dia 35 ( $p<0,05$ ) (Figura 1a). Após a segunda dose, o grupo suplementado teve um aumento de 2 vezes nos anticorpos, enquanto o grupo não suplementado aumentou 1,6 vezes entre os dias 21 e 28. Os sub-isotipos de IgG também apresentaram uma resposta semelhante, reforçando o efeito da suplementação no aumento dos anticorpos.

Para avaliar os níveis dos sub-isotipos de IgG foram utilizados soros dos equinos de ambos os grupos dos dias -7, 14 e 35 do experimento. Os níveis de IgGa, IgGb e IgGT foram mais elevados no grupo vacinado e suplementado (VS), tendo uma diferença de, respectivamente, 0, 3, 0,4 e 0,1 vez. Os sub-isotipos IgGa e IgGb apresentaram níveis elevados em comparação com IgGT, ambos tendo um aumento significativo de aproximadamente 3x no dia 14, com apenas uma dose de vacinação, e um aumento de 5x e 6x, respectivamente, no dia 35 com duas doses de vacinação. Enquanto, o sub-isótipo IgGT apresentou aumento de 5x no dia 35, com duas doses de vacinação, considerando que esse aumento de IgGT equivale ao valor de IgGa e IgGb do dia 14. Destaca-se que os níveis de IgGb foram mais altos que os demais sub-isotipos.



**Figura 1.** Dinâmica de anticorpos IgG totais e sub-isotipos IgGa, IgGb e IgGT específicos anti-rLiTT em equinos vacinados. A) Dinâmica de IgG total do grupo vacinado e suplementado continuamente com *B. toyonensis* (VS) e do grupo controle vacinado e não suplementado (V). B) Dinâmica dos sub-isotipos de IgGa do grupo vacinado e suplementado continuamente com *B. toyonensis* (VS) e do grupo controle vacinado e não suplementado (V). C) Dinâmica dos sub-isotipos de IgGb do grupo vacinado e suplementado continuamente com *B. toyonensis* (VS) e do grupo controle vacinado e não suplementado (V). D) Dinâmica dos sub-isotipos de IgGT do grupo vacinado e suplementado continuamente com *B. toyonensis* (VS) e do grupo controle vacinado e não suplementado (V).

A suplementação com *B. toyonensis* BCT-7112 tem se mostrado uma opção promissora para aumentar a efetividade da resposta vacinal, especialmente considerando vacinas com抗ígenos recombinantes (SANTOS *et al.*, 2021). Os sub-

isotipos de IgG podem ser indicadores indiretos das respostas dos linfócitos T e podem indicar uma resposta imune direcionada ao tipo de linfócito T auxiliar (por exemplo, Th1, Th2, etc.) (ESTES *et al.*, 2002). Aos sub-isotipos IgGa (IgG1) e IgGb (IgG4 e IgG7) são atribuídos com a capacidade de fixar complemento e mediar a citotoxicidade celular dependente de anticorpos, IgGT (IgG3 e IgG5) não possui tais características, no entanto, é eficiente em neutralizar toxinas (LEWIS *et al.*, 2008). De fato, IgGb (IgG4/7) foi sugerido como sendo mais importante nas respostas imunes mediadas por anticorpos protetores equinos a patógenos intracelulares (NELSON *et al.*, 1998; LOPEZ *et al.*, 2002; GOODMAN *et al.*, 2006). Nossos resultados demonstram que os valores de ELISA para o sub-isotipo de IgGb foram superiores do que os outros dois sub-isotipos em ambos os grupos (Fig.1c). Em estudos anteriores (SANTOS *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2018) realizados com抗ígenos diferentes (bacterinas e recombinantes) o sub-isotipo com maiores valores de ELISA foi o IgGT, diferindo do presente estudo onde o IgGb foi superior. Assim, pode-se sugerir que os altos valores de ELISA observados para IgGb se devem a um efeito mediado por suplementação com *B. toyonensis*. Observando a dinâmica do IgGT e IgGa, e seguindo a mesma hipótese do IgGb, pode-se sugerir que *B. toyonensis* também desempenha um papel na modulação destes sub-isotipos. Visto que, IgGa apresenta aumento nos valores de ELISA a partir do dia 14 (Fig. 1b) e IgGT mostra um aumento nos valores de ELISA no dia 35 no grupo suplementado (VS) e grupo controle (V), entretanto, o grupo suplementado (VS) apresentou valor significativo superiores comparando com o grupo controle.

#### **4. CONCLUSÕES**

Os resultados apresentados neste estudo demonstram que a suplementação contínua com *Bacillus toyonensis* BCT-7112 resultou na modulação da resposta imune vacinal contra *Lawsonia intracellularis* em equinos, com o aumento significativo nos níveis de sub-isotipos de IgG específicos anti-LiT. No entanto, são necessários mais estudos para melhor entender o(s) mecanismo(s) envolvidos na imunomodulação mediada por *B. toyonensis* BCT-7112 em equinos.

#### **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ABREU, M. C. *et al.* *Bacillus toyonensis amplifies the immunogenicity of an experimental recombinant tetanus vaccine in horses*. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 140, p. 105135, 2024.
- COOPER, D. M.; GEBHART, C. J. Comparative aspects of proliferative enteritis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 212, n. 9, p. 1446–1451, 1 maio 1998.
- JIMÉNEZ, A. P. *et al.* Associação à positividade da *Lawsonia intracellularis* com a expressão clínico-patológica da infecção em suínos da região metropolitana de Bucaramanga (Santander, Colômbia). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 70, p. 181–186, 2018.
- PAGE, A. E. *et al.* Acute Deterioration and Death with Necrotizing Enteritis Associated with *Lawsonia intracellularis* in 4 Weanling Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 26, n. 6, p. 1476–1480, 5 out. 2012.
- ROOS, T. B. *et al.* Effect of *Bacillus cereus* var. *Toyoi* and *Saccharomyces boulardii* on the immune response of sheep to vaccines. *Food and Agricultural Immunology*, v. 21, n. 2, p. 113–118, jun. 2010a.
- SANTOS, AC *et al.* Immune response of adult horses, pregnant mares and foals to an experimental vaccine with recombinant EMA-2 protein of *Theileria equi*. *Res Vet Sci*;139:186–92. 2021.
- SANTOS, AC *et al.* Dynamics of humoral immune response in pregnant mares and foals vaccinated with *Theileria equi* recombinant EMA-2. *Pesqui Vet Bras*; 38:2018
- SANTOS, F. D. S. *et al.* *Bacillus toyonensis* improves immune response in the mice vaccinated with recombinant antigen of bovine herpesvirus type 5. *Beneficial Microbes*, v. 9, n. 1, p. 133–142, 29 jan. 2018.
- TANABE, S. *et al.* Anti-inflammatory and Intestinal Barrier-protective Activities of Commensal *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* in Thoroughbreds: Role of Probiotics in Diarrhea Prevention in Neonatal Thoroughbreds. *Journal of Equine Science*, v. 25, n. 2, p. 37–43, 2014.
- VISSCHER, C. *et al.* Spread of an Experimental *Salmonella Derby* Infection in Antibiotic-Treated or *Lawsonia intracellularis* Vaccinated Piglets. *Animals*, v. 8, n. 11, p. 206, 12 nov. 2018.