

ESPOROS INATIVADOS DE *BACILLUS SUBTILIS* COMO SISTEMA DE ENTREGA DE ANTÍGENO RECOMBINANTE DE *LAWSONIA INTRACELLULARIS*

NATÁLIA SILVA PERES¹; NEIDA LUCIA CONRAD²; ANA VITÓRIA COSTA³;
CAROLINA PELLIZZER DI GIACMO⁴; LEONARDO BRASIL FIGUEIREDO⁵;
FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – nataliaapeeres@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas – conradneida@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – anavitoriacost4@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – carolinapdigiacomo@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – leonardo.brasil.08@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A suinocultura é um setor de grande importância para o Brasil. De acordo com a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) em 2024, o país produziu 5,3 milhões de toneladas de carne suína, sendo 1,3 milhões de toneladas destinadas à exportação. Devido à importância deste setor, é crescente a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos e vacinas que visem a prevenção de doenças infecciosas, responsáveis pela diminuição dos rendimentos de produção e pela sanidade do produto final (GUEDES *et al.*, 2022).

Lawsonia intracellularis é uma bactéria Gram-negativa, intracelular obrigatória e responsável por causar a Enteropatia Proliferativa Suína (EPS), uma doença economicamente importante para a suinocultura (GEBHART, 2014). Suínos acometidos pela forma aguda da EP podem manifestar diarreia sanguinolenta e óbito rápido (GEBHART, 2014), já os acometidos pela forma crônica podem apresentar uma diminuição do crescimento e aumento na frequência de natimortos quando em caso de suínos gestantes (GUEDES *et al.*, 2017).

A vacinação é a melhor medida profilática contra *L. intracellularis*, contribuindo também para a diminuição de infecções secundárias, como as causadas por *Salmonella* spp. (LEITE *et al.*, 2018). Atualmente algumas das vacinas disponíveis contra a EPS são vacinas vivas, desenvolvidas a partir de culturas de células em suspensão (ROERINK *et al.*, 2018). As vacinas vivas possuem processos onerosos como a dificuldade dos sistemas de cultivo *in vitro* (VANNUCCI *et al.*, 2012). Visando contornar a problemática quanto à produção de vacinas vivas utilizando *L. intracellularis*, sugere-se o desenvolvimento de vacinas recombinantes baseadas em proteínas imunogênicas (MONTESINO *et al.*, 2019).

Bacillus subtilis é uma bactéria Gram-positiva, não patogênica, formador de esporos (LIU *et al.*, 2024). Os esporos apresentam estabilidade e resistência, sobrevivendo em estado latente por longos períodos apesar da ausência de nutrientes e em condições de temperaturas extremas, além de serem resistentes à radiação UV e enzimas líticas (MATTOSSOVICH *et al.*, 2017).

Esporos de *B. subtilis* podem ser utilizados como sistema de entrega de antígenos para o desenvolvimento de vacinas, possui diversas vantagens frente a outros sistemas, incluindo maior estabilidade e segurança (BATISTA *et al.*, 2014). A exibição de proteínas na superfície de esporos de *B. subtilis*, foi relatada pela primeira vez por Istickato *et al.* em 2001 e possui características notáveis, como a

diminuição da rápida degradação do antígeno, que pode ser frequentemente observada em outras sistemas de entrega (RICCA *et al.*, 2014).

Antígenos podem ser exibidos na superfície de esporos através de uma abordagem recombinante ou não recombinante (ISTICATO; RICCA, 2014). A abordagem não recombinante envolve a adsorção de um antígeno purificado diretamente na superfície de esporos não modificados geneticamente e purificados (RICCA *et al.*, 2014). A eficiência da adsorção de antígenos na superfície de esporos de *B. subtilis* é enfatizada em estudos como os de Huang *et al.* (2010), Song *et al.* (2012) e Reljic *et al.* (2013), onde os animais vacinados com esporos adsorvidos com antígenos foram capazes de gerar uma imunidade protetora. A abordagem não recombinante também é mais eficiente, quando comparada a abordagem recombinante pois utiliza até 70 vezes menos esporos para fornecer uma quantidade semelhante de antígeno e permite a exibição de antígenos multiméricos em sua forma nativa, assim garantindo o reconhecimento do receptor natural e uma ativação adequada do sistema imunológico (ISTICATO *et al.*, 2013).

O presente estudo tem como objetivo avaliar a adsorção do antígeno recombinante específico de *L. intracellularis* (Li_full) em esporos inativados de *B. subtilis* com o propósito de contribuir para a mitigação das infecções causadas por esse microrganismo em suínos. Ao explorar essa abordagem, busca-se promover avanços na profilaxia da EPS, gerar impactos na saúde animal e na produtividade da suinocultura.

2. METODOLOGIA

O microrganismo *B. subtilis* foi cultivado em 25 ml de caldo *Luria Bertani* (LB) por 18 horas em agitador orbital com incubadora à 150 rpm e 37 °C, posteriormente esse cultivo foi transferido para frasco *Erlenmeyer* contendo 100 ml de caldo *Nutrient Yeast Extract Salt Medium* (NYSM) (Yousten, 1984) e cultivado por 72 horas agitador orbital com incubadora à 150 rpm e 37 °C, para indução da esporulação. A pureza do cultivo foi avaliada através da coloração de Gram e semeadura por esgotamento em meios *Brain Heart Infusion Agar* (BHI ágar) e *Sabouraud Agar*.

Após 72 horas de indução da esporulação em meio NYSM, o cultivo de *B. subtilis* foi submetido ao protocolo de purificação dos esporos descrito por Tavares *et al.* (2013). Ao final da purificação, os esporos foram avaliados através da coloração de Wish-Conklin (WIRTZ, 1908; CONKLIN, 1934) para avaliar o processo de purificação e a presença de células vegetativas. A concentração de esporos foi determinada com espectrofotômetro medindo a densidade óptica no espectro visível ($\lambda=600$ nm). Para realização da inativação, os esporos purificados foram submetidos à esterilização por calor úmido em autoclave vertical a 121 °C e pressão de 1 atm por 20 minutos.

A adsorção do antígeno recombinante Li_full em esporos inativados de *B. subtilis* foi realizada conforme descrito por Huang *et al.* (2010) e consistiu nas seguintes etapas: 1. Etapa de adição do antígeno: 30 μ g de Li_full foi adicionado à uma suspensão de 100 μ l de 2×10^9 esporos purificados e inativados; 2. Etapa de ligação: a fração obtida a partir da homogeneização do antígeno Li_full com os esporos foi suspensa em 164 μ l do tampão de ligação citrato de sódio 50 mM (pH 4.0), permanecendo sob agitação contínua em temperatura ambiente (25 °C) por 1 hora. Após esse período, o conteúdo foi centrifugado a 11750 x g por 10 minutos e o *pellet* obtido foi identificado e armazenado em uma temperatura de - 20 °C. A avaliação da adsorção de Li_full em esporos inativados de *B. subtilis* foi realizada

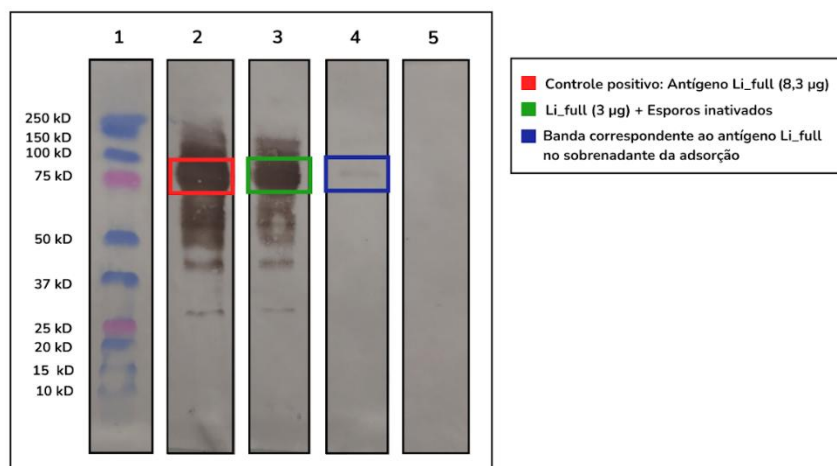
através da técnica de *Western blotting*, utilizando anticorpos de camundongos específicos contra Li_full pertencente a soroteca do Laboratório de Microbiologia. Para realização da técnica de *Western blotting* foram utilizadas as seguintes amostras: 8,3 µg do antígeno Li_full purificado (como controle positivo), 3 µg do pellet da reação de adsorção, 10 µl do sobrenadante da reação de adsorção e 10 µl de esporos inativados de *B. subtilis* (como controle negativo).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise do resultado obtido utilizando a técnica de *Western blotting*, é possível visualizar na terceira coluna da Figura 1 a presença de uma banda corresponde ao peso molecular do antígeno, 76,3 kDa. A presença dessa banda sugere que o antígeno Li_full foi adsorvido aos esporos inativados de *B. subtilis*. Comparando a segunda e a terceira coluna, referentes ao controle da reação e à reação de adsorção respectivamente, é possível visualizar a semelhança entre as bandas, o que reforça o sucesso da adsorção do antígeno Li_full aos esporos inativados de *B. subtilis*. Diferentes quantidades de antígeno foram administradas nesse ensaio, para o controle da reação foi utilizado 8,3 µg do antígeno, enquanto para a avaliação da adsorção foi utilizado 3 µg do antígeno, o que explica a menor intensidade da banda presente na terceira coluna em relação a da segunda coluna.

A análise do sobrenadante da reação de adsorção (quarta coluna) indica a presença de uma banda fraca, sugerindo que os esporos não adsorveram totalmente a quantidade do antígeno administrado na reação.

Figura 1 - Adsorção do Antígeno Recombinante Li_full em Esporos de *B. subtilis* Inativados



Fonte: Imagem elaborada pelo autor, 2025. Legenda: (1) Marcador molecular (Bio-Rad); (2) Controle positivo - antígeno Li_full (8,3 µg); (3) Adsorção do antígeno Li_full em esporos inativados de *B. subtilis*; (4) Sobrenadante da adsorção de Li_full em esporos inativados de *B. subtilis*; (5) Controle negativo da adsorção - esporos inativados de *B. subtilis*.

O resultado obtido no presente estudo sugere que os esporos inativados de *B. subtilis* foram capazes de adsorver o antígeno recombinante Li_full, podendo ser um potencial sistema de entrega para esse antígeno. A intensidade semelhante da banda correspondente a adsorção do antígeno que está em uma menor concentração em relação a banda controle, pode ser explicada pelo ponto proposto por RICCA *et al.* (2014) de que a estabilidade observada pela interação do antígeno

com a superfície do esporo pode proporcionar a diminuição da degradação de antígenos.

Ensaio futuros visam equalizar a quantidade de proteína das amostras para padronizar o perfil de adsorção. A utilização de esporos inativados comparado ao uso de esporos viáveis se destaca como uma alternativa considerada mais segura para o desenvolvimento de vacinas, principalmente considerando indivíduos imunocomprometidos, pois o esporo não possui mais a capacidade de germinação e disseminação no organismo e também no ambiente durante o processo de preparação das vacinas (SOUZA *et al.*, 2014)

4. CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi avaliada a adsorção do antígeno recombinante de *L. intracellularis*, Li_full, em esporos inativados de *B. subtilis*. Os resultados obtidos indicam a capacidade dos esporos inativados de *B. subtilis* de adsorverem o antígeno, cumprindo assim os objetivos propostos. Os resultados sugerem ainda que a adsorção é uma metodologia válida para promover a exibição de antígenos recombinantes na superfície de esporos de *B. subtilis*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2025. Disponível em: <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2025/04/ABPA.-Relatorio-Anual-2025.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2025.

GUEDES, R. M. C. et al. Validation of an Immunoperoxidase Monolayer Assay as a Serologic Test for Porcine Proliferative Enteropathy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, n. 6, p. 528–530, 1 jan. 2002. DOI: 10.1177/104063870201400618. Acesso em: 15 ago. 2025.

GUEDES, R. M. C. et al. Lawsonia intracellularis in Pigs: **Progression of Lesions and Involvement of Apoptosis. Veterinary Pathology**, v. 54, n. 4, p. 620–628, 24 jul. 2017. DOI: 10.1177/0300985817698206. Acesso em: 15 ago. 2025.

LEITE, F. L. L. et al. Vaccination Against Lawsonia intracellularis Decreases Shedding of Salmonella enterica serovar Typhimurium in Co-Infected Pigs and Alters the Gut Microbiome. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2857, 12 fev. 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-21255-7. Acesso em: 15 ago. 2025.

ROERINK, F. et al. A novel inactivated vaccine against Lawsonia intracellularis induces rapid induction of humoral immunity, reduction of bacterial shedding and provides robust gut barrier function. **Vaccine**, v. 36, n. 11, p. 1500–1508, mar. 2018. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.12.049. Acesso em: 15 ago. 2025.

MONTESINO, R. et al. Multi-antigenic recombinant subunit vaccine against Lawsonia intracellularis: The etiological agent of porcine proliferative enteropathy. **Vaccine**, v. 37, n. 10, p. 1340–1349, fev. 2019. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.01.029. Acesso em: 15 ago. 2025.