

ESTRATÉGIAS PARA PRODUÇÃO DE VACINA RECOMBINANTE CONTRA *C. PERFRINGENS* TIPO A

RAFAEL AMARAL DONASSOLO¹; MARCOS ROBERTO ALVES FERREIRA²;
EMILI GRIEP², MARCELO MENDONÇA², ANGELA NUNES MOREIRA², FABRICIO
ROCHEDO CONCEIÇÃO³

^{1 2 3} Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas,
Pelotas/RS, Brasil

E-mails: rafaeldonassolo@hotmail.com (autor); fabricio.rochedo@ufpel.edu.br
(orientador)

1. INTRODUÇÃO

Clostridium perfringens é uma bactéria comum no ambiente e no trato gastrointestinal de humanos, animais domésticos e selvagens (SONGER, 1996). São micro-organismos anaeróbios, porém conseguem sobreviver em locais com baixos níveis de oxigênio (McCLANE, 2006). Sob condições desfavoráveis esses micro-organismos produzem esporos que lhes garantem a sobrevivência por longos períodos (SONGER, 1996).

São classificados em cinco tipos (A, B, C, D e E), conforme a produção das quatro toxinas principais (alfa, beta, épsilon e iota) (NILLO et al., 1980). *C. perfringens* Tipo A produz toxina Alfa (Cpa), sua atividade caracteriza-se por hemólise intravascular, agregação plaquetária, danos capilares e processos inflamatórios. Dentre as doenças de importância veterinária destacam-se a gangrena gasosa e a enterotoxemia hemorrágica em ovinos, bovinos, caprinos, equinos, cães, etc. (LI et al., 2013). Atualmente um interessante campo de pesquisa nessa temática é o desenvolvimento de vacinas recombinantes para aplicação em medicina veterinária, visando substituir as vacinas toxóides, que apresentam alguns entraves na produção como risco toxicológico e baixo rendimento, além do fato dessas vacinas muitas vezes falharem na indução da imunidade, entre outros (LOBATO et al., 2004).

A proibição do uso indiscriminado de antibióticos na terapêutica de enfermidades bacterianas e aditivos alimentares para animais visam diminuir a emergência de micro-organismos multirresistentes. A utilização de antibióticos na indústria de vacinas recombinantes requer custo adicional tanto do antibiótico como do tratamento do efluente antes do descarte. O Isopropil-β-D-1-thiogalactopiranósideo (IPTG) é um análogo sintético da lactose utilizado na indução da expressão de proteínas recombinantes. Além do alto custo, não há estudos a longo prazo dos riscos da utilização desse composto tanto para administração em animais como para o meio ambiente. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a substituição do IPTG por lactose comercial e a retirada total do antibiótico na expressão de Cpa recombinante (rCpa).

2. METODOLOGIA

Pré-inóculo e Expressão de rCpa

Para a padronização do pré-inóculo, a cepa recombinante *E. coli* BL21 (DE3) StarTM/pET28a/Cpa foi cultivada a 37 °C em meio Terrific Broth (TB) (23,6 g/L Extrato de levedura; 11,8 g/L Triptona; 9,4 g/L fosfato de potássio ; 2,2 g/L fosfato monopotássio ; 0,4 % de glicerol; 0,5 % glicose e pH 7,2) com 50 µg/ml de Kanamicina até o terço final da fase log de crescimento (Absorbância 600 nm [A₆₀₀] 0,8). O volume de pré-inóculo foi calculado considerando Abs 0,1 em volume de 100 ml (Volume de pré-inóculo x A₆₀₀ pré-inóculo = Volume final x A₆₀₀ inóculo). O volume determinado foi centrifugado e o pellet celular ressuspandido em 5 ml de meio TB com 25 % de glicerol e estocado a -70 °C até o momento do uso.

A expressão de Cpa foi realizada através da adição de 5 ml de pré-inóculo (estoque) em 95 ml de meio TB e posteriormente cultivadas á 37 °C. Os frascos foram nomeados conforme a variável analisada: IPTG – 50 µg/ml de Kanamicina + 50 mM IPTG; LAC C/A – 50 µg/ml de Kanamicina + 2 g/L D-lactose e LAC S/A – sem antibiótico + 2 g/L D-lactose. Nos frascos 2 e 3 a D-Lactose foi adicionada no momento do preparo do meio TB, pois a lactose só induz expressão após o consumo total da glicose e o IPTG induz a expressão mesmo na presença de glicose, por isso, no frasco 01 o IPTG foi adicionado após o consumo da glicose, com concentração final de 0,5 mM.

Viabilidade celular, estabilidade dos vetores recombinantes e curva de crescimento

Após a adição do pré-inóculo (Tempo 1), imediatamente antes da indução (Tempo 2) e após três horas de indução (Tempo 3) foram coletados 1 ml do inóculo para determinação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) através de diluições seriadas plaqueadas em duplicatas, sendo duas placas com LB + 50 µg/ml de Kanamicina (C/A) e duas com LB sem antibiótico (S/A), objetivando determinar a estabilidade do plasmídeo nas diferentes variáveis (S/A – C/A = células sem plasmídeo). Para determinação da curva de crescimento da cepa *E. coli* BL21 (DE3) Star®/pET28a/Cpa, a A₆₀₀ foi aferida a cada hora durante 9 h.

Consumo de D-Glicose

A curva do consumo de glicose foi determinada utilizando 10 µL de meio a cada hora de cultivo. Para isso, 1 mL do inóculo foi centrifugado a 12.000 xg por 2 min e o sobrenadante analisado imediatamente após a coleta, utilizando-se o Kit Glicose liquiform© (Labtest).

Quantificação de rCpa

O pellet de 1 mL do cultivo antes e após a indução, foi ressuspandido em 80 µL de PBS + 20 µL de tampão de amostra 5X e fervido a 100 °C por 10 min para eletroforese em SDS-(PAGE) 12%. Uma curva de diferentes concentrações de Albumina Sérica Bovina (BSA) foi utilizada para determinação da concentração rCpa através do software TotalLab Quant®.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na produção de proteínas recombinantes, *E. coli* tem sido o micro-organismo mais utilizado e a indução da expressão é realizada através do controle do operon *lac*, que naturalmente é ativado na presença de lactose (JACOB & MANOD, 1961). O IPTG é utilizado com a finalidade de substituir a lactose, no entanto apresenta inúmeras desvantagens como toxicidade, indução de maior concentração de proteínas insolúveis, necessidade de monitoramento da absorbância para indução e permanência desse composto no efluente da indústria ou de forma residual nas vacinas (GUTHERTZ et al., 2015). Desta forma, o presente estudo utilizou o meio de cultivo denominado de “autoindução” em que a lactose é utilizada como indutor. As vantagens são que a indução ocorre de forma espontânea após o consumo da glicose, a lactose é totalmente degradada e favorece a expressão de proteínas solúveis (GUTHERTZ et al., 2015).

Outros compostos largamente utilizados nessa tecnologia são os antibióticos que selecionam apenas os micro-organismos recombinantes no cultivo. A descontaminação dos resíduos industriais antes de serem desprezados é obrigatória para que não haja seleção de micro-organismos resistentes no meio-ambiente, e com isso, risco à saúde pública.

E. coli BL21(DE3) Star/pET28a/Cpa

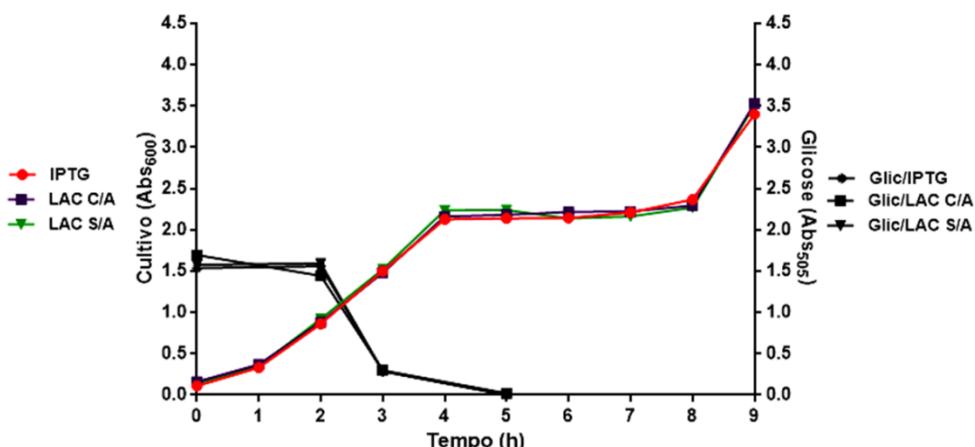


Figura 1. Curva de crescimento de *E. coli* BL21(DE3) StarTM/pET28a/Cpa mensurada a 600 nm a cada hora (Abs₆₀₀) por nove horas .

A curva de crescimento constituiu-se de uma hora de adaptação (fase lag), três horas de crescimento exponencial (fase log) e quatro horas de fase estacionária, não havendo diferença visual entre as variáveis (Figura 01). A curva do consumo de glicose pelos micro-organismos decresceu como esperado, chegando ao nível zero às cinco horas de cultivo.

A estabilidade do plasmídeo no T1, T2 e T3 não variou entre. No entanto, o cultivo LAC S/A mostrou maior número de células sem plasmídeo em todas as contagens. A presença de alto número de células sem plasmídeo no T1 indica que estavam presentes no pré-inóculo e por não haver ação do antibiótico, mantiveram-se no cultivo (Tabela 1).

Tabela 1. Contagem das unidades formadoras de colônia nas diferentes variáveis.

Tempo	IPTG ($\times 10^7$)		LAC C/A($\times 10^7$)		LAC S/A($\times 10^7$)	
	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A
T1	3	0,9	2,5	1,5	7,5	0,9
T2	1,7	1,4	1,2	1,1	6	1
T3	30	10	30	20	60	20

Quanto a quantificação da expressão de rCpa, os cultivos IPTG, LAC C/A e LAC S/A apresentaram 144,6 µg/ml, 137,8 µg/ml e 136,6 µg/ml, respectivamente. LI et al. (2011), assim como no presente estudo, demonstrou que a utilização do meio de autoindução permite a obtenção de alta expressão de proteínas.

4. CONCLUSÕES

Esses resultados demonstram o potencial de aplicação do meio de cultivo sem antibiótico e a lactose como indutor na expressão de rCPA, simplificando o tratamento do efluente gerado na produção de vacina contra *C. perfringens* tipo A.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LI, J.; ADAMS, V.; BANNAM, T.; MIYAMOTO, K.; GARCIA, J.; UZAL, F.; MCCLANE, B. Toxin plasmids of *Clostridium perfringens*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.77, n.2, p.208–33, 2013.

SONGER, J. Clostridial enteric diseases of domestic animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v.9, n.2, p.216–34, 1996.

MCCLANE, B.; UZALL, F.; MIYAKAWA, M.; LIERLY, D.; WILKINS, T. The enterotoxic clostridia. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBURG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. (Eds.), **The prokaryotes**. New York: Springer, 2006. 4th ed., p.698–752.

LOBATO, F.; ANTUNES, R.; BALSAMÃO, G.; VIEGAS, V.; AURÉLIO, R.; NEVES, R. Eficácia de vacinas comerciais contra clostrídios frente ao desafio com *Clostridium sordellii*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.2, p.439-442, 2004.

NILLO, L. *Clostridium perfringens* in Animal Disease: A Review of Current Knowledge. **The Canadian Veterinary Journal**, v.21, n.5, p.141–148, 1980.

JACOB, F.; MONOD, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. **Journal of Molecular Biology**, v.3, p.318–356, 1961.

GUTHERTZ, N.; KLOPP, J.; WINTERHALTER, A.; FERNÁNDEZ, C.; GOSSERT, A.D. Auto-inducing media for uniform isotope labeling of proteins with ¹⁵N, ¹³C and ²H. **Journal of Biomolecular NMR**, v.62, n.2, p.169-177, 2015.