

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERINA RECOMBINANTE CONTRA O BOTULISMO BOVINO

RAFAEL LOPES ROSA¹; CLÓVIS MOREIRA JR.²; CARLOS EDUARDO POUHEY DA CUNHA³; GUSTAVO MARÇAL SCHMIDT GARCIA MOREIRA⁴; MARCELO MENDONÇA⁵; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO⁶

¹ Laboratório de Imunologia Aplicada, Biotecnologia, CDTec, UFPEl – rafaelbiotec@gmail.com

² Laboratório de Imunologia Aplicada, Biotecnologia, CDTec, UFPEl – clovismoreirajr@live.com;

³ Laboratório de Imunologia Aplicada, Biotecnologia, CDTec, UFPEl – cpouey@gmail.com;

⁴ Laboratório de Imunologia Aplicada, Biotecnologia, CDTec, UFPEl – moreira.gmsg@gmail.com;

⁵ Laboratório de Imunologia Aplicada, Biotecnologia, CDTec, UFPEl -

marcelomendoncavet@yahoo.com.br

⁶ Laboratório de Imunologia Aplicada, Biotecnologia, CDTec, UFPEl –

fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O botulismo é uma doença fatal caracterizada por paralisia muscular causada por neurotoxinas produzidas pela bactéria *Clostridium botulinum*, um bacilo anaeróbio formador de esporos, encontrado no solo, água e matéria orgânica (Smith, 2009). Devido à produção de esporos, esse micro-organismo pode se tornar viável por um longo período de tempo e, ao encontrar ambiente favorável (matéria orgânica em decomposição) são capazes de germinar e proliferar produzindo as neurotoxinas que ao serem ingeridas causam a intoxicação (Karalewitz, 2012).

As neurotoxinas botulínicas (BoNTs) são classificadas por suas diferenças antigênicas em oito sorotipos (A-H) (Dover, 2014). Os sorotipos C e D são responsáveis por causar botulismo em bovinos, principalmente na forma de surtos, sendo considerado uma das principais causas de mortalidade em bovinos nas últimas décadas (Maboni, 2010). Estruturalmente, as BoNTs apresentam uma cadeia pesada (HC), de 100 kDa, e uma cadeia leve (LC), de 50 kDa, formando três domínios característicos. O domínio catalítico, constituído pela LC, é ligado por uma ponte dissulfeto ao domínio de translocação, que constitui a porção N-terminal da HC. A porção C-terminal da HC, atóxica, constitui o domínio de ligação ao receptor neuronal, onde estão localizados os epítomos protetores das BoNTs (Clayton, 1995; Lam, 2015). O mecanismo de ação das BoNTs envolve o bloqueio nervoso pré-sináptico por inibição da liberação de acetilcolina na placa motora, resultando em paralisia flácida progressiva e morte por parada respiratória (Smith, 2009).

A vacinação é a forma mais efetiva para controlar o botulismo bovino (Lee, 2007) visto que a proteção se dá pela neutralização da toxina por anticorpos pré-formados na corrente sanguínea dos animais vacinados, impedindo assim a ligação da toxina ao receptor neuronal. Atualmente, as vacinas disponibilizadas no mercado são elaboradas com a toxina nativa detoxificada com formaldeído (toxóide), que apesar da eficiência, possui produção laboriosa, perigosa e pouco previsível. Dessa forma, o desenvolvimento de vacinas recombinantes visa eliminar essas limitações.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e avaliar uma bacterina recombinante contra o botulismo bovino.

2. METODOLOGIA

Clonagem molecular

O gene sintético codificando para porção Hc das BoNTs sorotipos C e D, contendo códons preferenciais para *E. coli* foi entregue no vetor de clonagem pUC19 pela Epoch Biolabs, Inc. (USA). Os genes *c* e *d* foram obtidos através da clivagem com enzimas de restrição específicas e subclonados no vetor de expressão em *E. coli* pAE, através da reação com T4 DNA Ligase (Thermo Scientific), resultando nas construções pAE/*c* e pAE/*d*. As clonagens foram confirmadas através da análise por digestão do DNA plasmidial, seguido por eletroforese em gel de agarose 0,8%, liberando fragmento de massa molecular compatível com o inserto.

Expressão e caracterização das proteínas rHcC e rHcD

Os plasmídeo pAE/*c* e pAE/*d* foram utilizados para transformar cepas *E. coli* BL21 (DE3) pLysS e *E. coli* BL21 (DE3) Star eletrocompetentes, respectivamente, por choque térmico. As células transformadas foram cultivadas em 50 mL caldo LB contendo 100 µg/mL de ampicilina em agitador orbital (180 RPM, 37 °C, 16 h). Após essa etapa, o volume foi transferido para um erlemeyer contendo 450 mL de LB com ampicilina, até atingir a densidade óptica ($DO_{600}=0,6-0,8$). Nesse momento, os cultivos foram induzidos com isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a uma concentração final de 0,5 mM por 3 h nas mesmas condições. Em seguida, o cultivo foi centrifugado (10.000 × g; 4 °C; 10 min), ressuspenso em PBS e inativado pela adição de 0,2 % (v/v) de formaldeído. A inativação foi confirmada pelo cultivo de 100 µL em ágar LB, por 24 h a 37°C. A expressão das proteínas recombinantes rHcC e rHcD foi avaliada por SDS-PAGE 12% e caracterizada através de *Western blot* utilizando o anticorpo monoclonal Anti-polihistidina (Sigma Aldrich).

Vacinação

Vinte e quatro cobaios, divididos em 3 grupos de 8 animais cada, foram vacinados por via subcutânea nos dias 0 e 21. O grupo 1 foi imunizado com bacterina recombinante contendo aproximadamente 200 µg de cada proteína (rHcC e rHcD) co-administrada e adsorvida ao adjuvante Al(OH)₃ 10%. O Grupo 2 foi imunizado com uma vacina comercial, enquanto o grupo 3 foi vacinado com bacterina não recombinante adsorvida ao Al(OH)₃ 10% (controle negativo). No dia 42, amostras de sangue dos animais foram coletadas por punção cardíaca e o soro separado por centrifugação (3000 × g, 7 min) e congelado.

Avaliação da resposta imune humoral

A resposta imune humoral foi avaliada através de ensaio de soro-neutralização em camundongos, como descrito pela normativa nº 23 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Resumidamente, 1 L+ de cada toxina nativa padronizada foi incubada por 60 min a 37 °C com 1 ml do pool de soro diluído (1:2, 1:3, 1:5, 1:10 e 1:20) e não diluído. 1 L+ é a dose mínima de toxina que, após incubação com 1 UI/ml do antisoro padrão, ainda é capaz de causar a morte de toda população de camundongos. Após o período de incubação, dois camundongos, foram inoculados por via endovenosa e observados quanto a sobrevivência por 72 h. O título, expresso em unidades internacionais por ml (UI/ml), foi calculado diretamente como a menor diluição de

soro que, mesmo após a incubação com 1 L+ de BoNT, ainda foi capaz de causar a morte dos camundongos inoculados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão das proteínas rHcC (Figura 1A) e rHcD (Figura 1B) foi avaliada por SDS-PAGE 12%, sendo possível observar a banda com massa molecular aparente de 50 KDa nas bacterinas, correspondente à Hc. A proteína rHcC foi expressa de forma insolúvel, presente no *pellet* da lise do cultivo, diferentemente da rHcD, presente no sobrenadante da lise do cultivo na forma solúvel. As proteínas recombinantes foram caracterizada por *Western Blot* (Figura 1C) apresentando apenas uma banda íntegra com a massa molecular esperada de 50 kDa, reativa com anticorpo monoclonal anti-histidina.

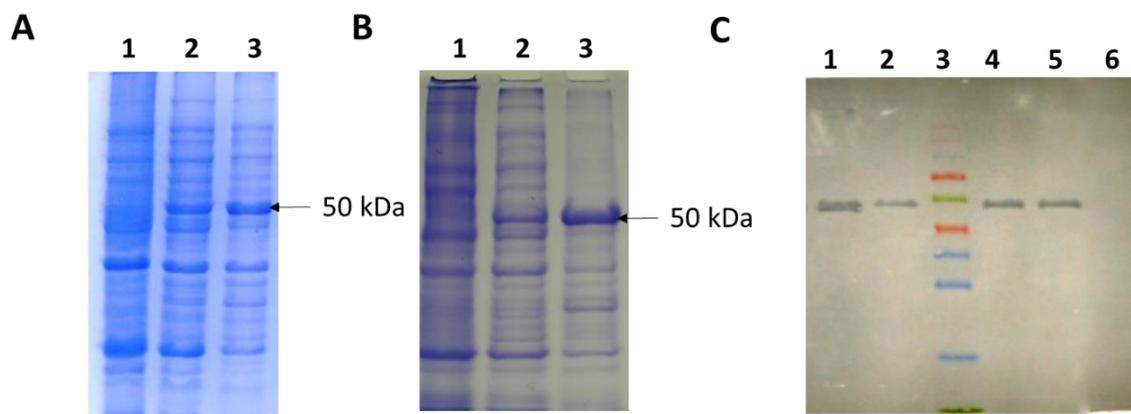


Figura 1. SDS-PAGE 12% da expressão das proteínas rHcC e rHcD e caracterização por *Western blot*

A. Expressão da rHcC 1- *E. coli* BL21 (DE3) pLysS não transformada; 2- *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformada com pAE/c induzida com IPTG (bacterina rHcC); 3- *Pellet* da lise do cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformada com pAE/c induzida com IPTG; **B.** Expressão da rHcD 1- *E. coli* BL21 (DE3) Star não transformada; 2- *E. coli* BL21 (DE3) Star transformada com pAE/d induzida com IPTG (bacterina rHcD); 3- Sobrenadante da lise do cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) Star transformada com pAE/d induzida com IPTG. **C.** *Western blot* com anticorpo anti-histidina conjugado a peroxidase e revelado por DAB 1: rHcC purificada; 2: bacterina rHcC; 3: Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific); 4: rHcD purificada; 5: bacterina rHcD; 6: *E. coli* BL21 (DE3) pLysS não transformada (controle negativo).

A formulação contendo a bacterina recombinante foi capaz de induzir 12 UI/ml de antitoxina C e 20 UI/ml de antitoxina D, enquanto que a vacina comercial induziu 6 UI/ml de antitoxina C e 10 UI/ml de antitoxina D. A formulação contendo bacterina não recombinante (controle negativo) não foi capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes antibotulínicos em cobaias.

A bacterina recombinante desenvolvida no presente trabalho foi capaz de induzir até 10 vezes mais anticorpos neutralizantes do que os exigidos oficialmente pelo MAPA (5 UI/ml de antitoxina C e 2 UI/ml de antitoxina D) para a aprovação das vacinas comercializadas para a prevenção do botulismo bovino no Brasil (Brasil, 2002).

Atualmente, a produção das vacinas comercializadas requer etapas de fermentação, isolamento, purificação e detoxificação, tornando o processo laborioso. Bactérias do gênero *Clostridium* sp. necessitam de 7 a 10 dias para a expressão das BoNTs em fermentador, e de 5 a 20 dias para a inativação da toxina nativa (Smith, 2009). Por outro lado, a bacterina recombinante produzida

em *E. coli* necessita de apenas 3 dias para a expressão das proteínas e inativação do cultivo com formaldeído, dispensando as etapas de isolamento e purificação, e com isso, diminuindo o tempo e os custos de produção, além de não apresentarem riscos quanto a biossegurança por serem atóxicas.

Sendo assim, o desenvolvimento de bacterina recombinante buscou aliar as vantagens da produção de bacterinas com a segurança e previsibilidade das vacinas recombinantes.

4. CONCLUSÕES

A vacina desenvolvida contendo as bacterinas recombinantes foi capaz de induzir títulos de anticorpos neutralizantes antibotulínicos superiores ao induzido pela vacina comercial, demonstrando um potencial promissor para o uso na prevenção do botulismo em bovinos. Futuramente, projeta-se a avaliação desta vacina na espécie alvo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SMITH, L. A. Botulism and vaccines for its prevention. **Vaccine**. United States of America, v.27, n.4, p.33-39, 2009.

KARALEWITZ, A.P. & BARBIERI, J.T. Vaccines against botulism. **Current opinion in microbiology**. 15(3). p. 317–24, 2012.

DOVER, N., BARASH, J. & HILL, K. Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type H gene. **Journal of Infectious Diseases Advance**. p. 1–11, 2014.

MABONI, F.; MONEGO, F.; MATIUZZI, M.; DUTRA I.; PALMIRA A. Ocorrência de Botulismo em Bovinos confinados no Rio Grande do Sul. **Ciência Animal**. Goiânia. v. 11, n.4, p. 962-965, 2010.

CLAYTON, M.A.; CLAYTON, J.M.; BROWN, D.R.; Protective vaccination with a recombinant fragment of *Clostridium botulinum* neurotoxin serotype A expressed from a synthetic gene in *Escherichia coli*. **Infect. Immun. Infection and Immunity** V.63, n.7, p.2738-2742, 1995.

LAM, K.H.; YAO, G.; JIN, R. Diverse binding modes, same goal: The receptor recognition mechanism of botulinum neurotoxin. **Elsevier**. California. V.117, n.2, p.225-231, 2015.

LEE, J.C.; HWANG, H.J.; SAKAGUCHI, Y.; YAMAMOTO, Y.; ARIMITSU, H., TSUJI, T.; WATANABE, T.; OHYAMA, T.; TSUCHIYA, T. & OGUMA, K. C terminal half fragment (50 kDa) of heavy chain components of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxins can be used as an effective vaccine. **Microbiology and immunology**. Okayama. V.51, n.4, p.445–55, 2007.

GREEN, M.; SAMBROOK, J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (*Fourth Edition*). **CSH PRESS** Melbourne. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução normativa n. 23. **Diário Oficial da União**. Brasília. 2002.