

INATIVAÇÃO DE BACTERINA DE *Escherichia coli* RECOMBINANTE EXPRESSANDO A PROTEÍNA rHcD

RAFAEL AMARAL DONASSOLO¹; MARCOS ROBERTO ALVES FERREIRA²;
CLOVIS MOREIRA JUNIOR³; MARINA DA SILVA MEDEIROS⁴; MORGANA LUDTKE
AZEVEDO⁵; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas- rafaeldonassolo@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas- marcosferreira.vet@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas- clovismoreirajr@live.com

⁴Universidade Federal de Pelotas- medeirosmarina82@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas- morganaludtke@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas- fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Com o advento das técnicas de DNA recombinante surgiram novas e eficientes metodologias para produção de vacinas farmacêuticas através da utilização de *Escherichia coli*, células de mamíferos ou leveduras (CLARK; CASSIDY-HANLEY, 2005). Entretanto para a produção de proteínas em sistemas heterólogos utilizando *E.coli* são necessários inúmeros passos para extração, purificação e solubilização das proteínas expressas em corpos de inclusão, tornando o processo demorado e oneroso. Um estudo realizado previamente pelo nosso grupo têm proposto a utilização das células inteiras inativadas de *E. coli* (bacterinas recombinantes) diretamente na imunização de animais (MOREIRA JR, 2016). Dentre as vantagens desse processo, podemos citar a eliminação das etapas de purificação das proteínas recombinantes, aumento da resposta imunológica pela utilização de adjuvantes de baixo custo e diminuição dos custos de produção das vacinas se comparado às proteínas recombinantes purificadas.

Entretanto, o uso de抗ígenos recombinantes não purificados oriundos de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) inativados necessitam uma maior avaliação quanto a biossegurança, uma vez que a presença de genes de resistência a antibióticos presentes nos vetores de expressão podem trazer riscos ao ambiente pela possibilidade de conjugação entre os micro-organismos. Tendo conhecimento desta problemática, têm-se buscado metodologias que sejam eficazes tanto na inativação da bactéria recombinante quanto do gene de resistência contido no vetor.

O formaldeído (CH_2O) é um composto incolor com odor forte, que possui propriedades antibacterianas e antifúngicas. A inativação química por formaldeído tem sido utilizada em processos de detoxificação nas indústrias farmacêuticas devido à capacidade de modificar a conformação de proteínas sem destruir os sítios imunogênicos das mesmas (ANDERSEN, 2007).

O timerosal ($\text{C}_9\text{H}_{19}\text{HgNaO}_2\text{S}$) é um composto organomercurial que possui características antifúngicas e antimicrobianas, geralmente é utilizado como conservante nas etapas iniciais de produção de vacinas e medicamentos. A ação antimicrobiana do timerosal está relacionada com a liberação do etilmercúrio após a separação do tiomersal em etilmercúrio e tiosalicilato. Estudos têm demonstrado a capacidade do timerosal em provocar alterações no DNA, sendo portanto um possível inativador do gene de resistência (BASKIN, 2003).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi testar os compostos formaldeído e timerosal como potenciais inativadores de cepa de *E.coli*

recombinante e do gene de resistência contido no vetor, fazendo com que o processo se torne seguro e compatível com as normas de biossegurança empregadas na produção industrial.

2. METODOLOGIA

O vetor de expressão pET/d foi utilizado para transformar a cepa *E. coli* BL21 (DE3) StarTM, por choque térmico, cultivado em caldo Luria Bertani (LB) suplementado com 100 µg/ml de canamicina e mantido em agitador orbital (37 °C, 180 rpm) até atingir densidade ótica à 600 nm (DO₆₀₀) entre 0,6 - 0,8, seguido de indução da expressão da proteína recombinante com 0,5 mM de IPTG (Isopropil β-D-1-thiogalactopiranósideo) por 4 horas. Após a expressão, o cultivo foi quantificado (UFC/ml) e fracionado em 4 frascos erlenmeyers com 150 ml de cultivo cada. Para avaliar a inativação do cultivo da expressão da proteína rHcD foi utilizado 0,2% (v/v) de formaldeído (1); 0,8% (v/v) de formaldeído (2); 0,01% de timerosal (3) sendo um cultivo mantido não inativado (4) como controle do processo.

Os cultivos foram mantidos por 7 dias em agitador orbital (37 °C, 180 rpm) sendo coletados 15 ml de cada frasco após 1, 3, 5 e 7 dias, para avaliar a eficácia da inativação em relação ao tempo de exposição. Posteriormente, foi realizada a extração do DNA plasmidial das amostras coletadas, sendo o produto das extrações utilizado para verificar a presença de DNA através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, transformar a cepa *E.coli* BL21 DH5α por choque térmico e como DNA template na amplificação mediante reação em cadeia da polimerase (PCR) com primers específicos para o gene que codifica para a proteína rHcD.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O DNA plasmidial extraído das amostras coletadas durante o experimento foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, onde foi possível constatar a presença do plasmídeo apenas no grupo controle, não sendo observado nos grupos tratados com formaldeído ou timerosal. Através da técnica de PCR com primers específicos e utilizando o DNA extraído das amostras como template, foi possível amplificar o gene *hcD* em todas as amostras coletadas no grupo controle (4) e no inativado com timerosal 0,01% (3). No cultivo inativado com 0,2 % de formaldeído (2) foi possível observar a amplificação nas amostras dos dias 1 e 3 de exposição e no cultivo inativado com 0,8% de formaldeído (1) houve amplificação somente na amostra do dia 1.

Após, os plasmídeos foram utilizados para transformar a cepa *E.coli* DH5α, por choque térmico, sendo possível observar crescimento de transformantes somente nas amostras coletadas no grupo controle (4), durante os 7 dias de experimento. A inativação dos cultivos é confirmada pela ausência de crescimento bacteriano após plaqueamento de 100 µL dos cultivos em ágar LB (37 °C, 24 h), 24 h após a exposição. Nos cultivos inativados com formaldeído (grupos 1 e 2) não foi observado crescimento de células viáveis, porém, a inativação com 0,01% de timerosal (3) não foi suficiente para inibir o crescimento bacteriano.

4. CONCLUSÃO

Os resultados demonstram a capacidade do formaldeído em inativar a cepa de *E.coli* BL21 (DE3) STAR™ após 24 h de exposição. Quanto à inativação dos plasmídeos, a exposição a uma concentração de 0,8% (v/v) de formaldeído foi capaz de inativar o plasmídeo e impedir a transformação em cepas de *E. coli* DH5 α quimiocompetentes. Da mesma forma, mesmo em condições experimentais utilizando a técnica de PCR para amplificação de sequências específicas de DNA, a exposição a 0,8% (v/v) de formaldeído por 3 dias ou a 0,2% (v/v) de formaldeído por 5 dias, foram capazes de interferir e impedir a amplificação da sequência alvo.

Tendo em vista o potencial uso de vacinas recombinantes não purificadas e o fato de não haver um método padronizado para avaliação da inativação para derivados de OGMs, nosso grupo de pesquisa busca desenvolver metodologias capazes de avaliar o emprego de agentes para inativação tanto das bactérias empregadas na expressão da proteína recombinante quanto dos plasmídeos presentes nas formulações vacinais, fazendo com que o processo se torne seguro e compatível com as normas de biossegurança empregadas na produção industrial.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Clark, T.; Cassidy-Hanley, D.. Recombinant Subunit Vaccines: Potential and Constraints. **Development in Biologicals** 2005, 121, 153–163.
- Moreira, C.; da Cunha, C. E. P.; Moreira, G. M. S. G.; Mendonça, M.; Salvarani, F. M.; Moreira, Â. N.; Conceição, F. R. Protective potential of recombinant non-purified botulinum neurotoxin serotypes C and D. **Anaerobe** 2016, 40, 58–62.
- Thaysen-Andersen, M.; Jørgensen, S.; Wilhelmsen, E.; Petersen, J.; Højrup, P. Investigation of the detoxification mechanism of formaldehyde-treated tetanus toxin. **Vaccine** 2007, 25, 2213–2227.
- Baskin, S. D.; Ngo, H.; Dikenko, V.V. Thimerosal Induces DNA Breaks, Caspase-3 Activation, Membrane Damage, and Cell Death in Cultured Human Neurons and Fibroblasts. **Toxicological Sciences** 2003, 74, 361-368.