

CONSTRUÇÃO DE UMA QUIMERA RECOMBINANTE CONTENDO OS DOMÍNIOS PROTETORES DAS TOXINAS ALFA E BETA DE *Clostridium perfringens*.

RAFAEL RODRIGUES RODRIGUES¹; RAFAEL AMARAL DONASSOLO;
MORGANA LUDTKE AZEVEDO; MARCOS ROBERTO ALVES FERREIRA;
ANGELA MOREIRA; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO⁶.

¹Universidade Federal de Pelotas- rafaelr458@gmail.com
Universidade Federal de Pelotas- rafaelandonassolo@hotmail.com
Universidade Federal de Pelotas- morganaludtke@gmail.com
Universidade Federal de Pelotas- marcosferreiravet@gmail.com
Universidade Federal de Pelotas- angelanmoreira@yahoo.com.br
⁶Universidade Federal de Pelotas- fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Clostridium perfringens é um bastonete Gram positivo e anaeróbio com capacidade de formação de esporos. Devido à capacidade de esporulação, é capaz de se manter potencialmente infectante no meio ambiente por longos períodos, representando um risco para animais domésticos (Lobato et al., 2013). Esta bactéria tem sido associada a uma variedade de doenças, que incluem: disenteria de cordeiro, enterite hemorrágica, enterotoxemia, gangrena gasosa, intoxicação alimentar e uma série de outras enfermidades graves (Zeng et al., 2011).

C. perfringens é classificado em cinco tipos (A, B, C, D e E) de acordo com a produção de quatro toxinas principais (alfa, beta, épsilon e iota) (Uzal, 2004). A toxina alfa (CPA) é uma fosfolipase C com sua ação caracterizada por hemólise intravascular, processos inflamatórios, danos capilares, agregação plaquetaria, entre outros (Songer, 1996). Essa toxina apresenta dois domínios, N e C terminal (CPA-N e CPA-C), o primeiro com atividade enzimática e o último responsável pela ligação na membrana da célula hospedeira (Sacuray et al., 2004). A toxina beta (CPB) apresenta capacidade de formar poros na membrana de células suscetíveis, levando ao ingurgitamento e lise celular (Vidal et al, 2009). O domínio C terminal de CPB (CPB-C) foi caracterizado recentemente como sendo imunogênico e suficiente para induzir anticorpos neutralizantes anti-CPB (Shreya et al., 2016). A tripsina possui potencial inibitório perante a toxina beta, podendo inibir sua função. Assim, animais recém-nascidos por possuírem baixos níveis de proteases gástricas, são particularmente acometidos (Sakurai & Duncan, 1978).

A imunoprofilaxia baseada na utilização de proteínas recombinantes são alternativas promissoras para o controle de doenças causadas por *C. perfringens*, (Milach et al., 2012). Estudos tem proposto o desenho racional de vacinas pela utilização de domínios imunoprotetores de toxinas, do mesmo ou de patógenos diferentes, para construção de quimeras recombinantes, mais imunogênicas e permitindo a produção de uma vacina polivalente em um único bioprocesso (Langrouri et al., 2013; Shreya et al., 2016). Por isso, o objetivo do presente estudo foi clonar, expressar e avaliar a antigenicidade de uma quimera recombinante (rBc-Ac) construída a partir de fragmentos considerados imunogênicos contra enterite necrótica de animais neonatos causada pelas toxinas CPA e CPB de *C. perfringens*.

2. METODOLOGIA

As regiões codificadoras (CDS) de CPB-C (*bc*) e CPA-C (*ac*) foram clonadas em fase, seguindo os parâmetros de clonagem descritos por (Sambrook e Russell, 2001). Foram desenhados iniciadores que flanqueiam cada CDS e sítios para enzimas de restrição foram inseridos nas extremidades de cada iniciador. O produto da PCR e o vetor pET28a foram purificados, digeridos com respectivas enzimas de restrição e posteriormente realizado uma reação de ligação utilizando enzima T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific). O produto da ligação foi utilizado para transformar, por eletroporação, células de *Escherichia coli* DH5 α quimiocompetentes. Posteriormente, as células foram plaqueadas em meio LB sólido suplementado com 100 μ g/mL de canamicina e cultivadas à 37 °C por 18 h. As colônias crescidas na placa foram cultivadas em meio LB líquido, cultivadas à 37 °C por 18 h, para posterior extração de DNA plasmidial. O DNA plasmidial dos clones recombinantes foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%, e caracterizado através de restrição enzimática e PCR.

Para expressão da quimera rBc-Ac foi utilizado o sistema heterólogo *E. coli* BL21 (DE3) StarTM, transformadas por choque térmico com o vetor pET28a/*bcac*. Após a transformação, procedeu-se o cultivo um pré-inóculo em 10 mL de LB suplementado com 100 μ g/mL de canamicina. No dia posterior, foi transferido 1 ml (10% do volume final de cultivo) de pré-inóculo para 9 mL de LB com a mesma concentração de canamicina. No terço final da fase logarítmica de crescimento ($DO_{600} = 0,6$ a 0,8), a expressão das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de 0,5 mM de isopropil β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Posteriormente, o cultivo foi incubado por 3 h a 37 °C sob agitação de 200 rpm. Após, 1 ml do cultivo foi retirado e centrifugado a (10.000 $\times g$; 4 °C; 10 min) para a avaliação da expressão através de SDS-PAGE. Posteriormente, foi avaliada a antigenicidade de rBc-Ac através da técnica de *western blot* utilizando soro padrão anti-CPB produzido em equino (NIBSC, UK) e anticorpos secundário conjugado com peroxidase (Sigma, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Clostridium perfringens é um importante patógeno causador de diarreia em animais neonatos. A infecção por *C. perfringens* tipo C em leitões recém-nascidos ocorre em minutos ou horas após o nascimento (Salvarani et al., 2013). No Brasil, esse patógeno foi identificado em 70% dos leitões diarreicos nos primeiros sete dias de vida (Cruz-Junior et al., 2013). A principal estratégia de controle e prevenção dessa enfermidade é a imunização passiva dos leitões.

As toxinas CPA e CPB recombinantes mostraram ser eficientes na imunização passiva de leitões (Salvarani et al. 2013). Entretanto, uma nova estratégia tem sido proposta na literatura, na qual, utiliza-se domínios protetores das toxinas para constituir uma molécula químérica tornando-a mais imunogênica e possibilitando sua produção em um único bioprocesso. Para isso, foi realizada a clonagem de *bc-ac* em pET28a, bem-sucedida, assim como a expressão em *E. coli* BL21 (DE3) StarTM, com massa esperada de 36,4 kDa, conforme observado na figura 1A.

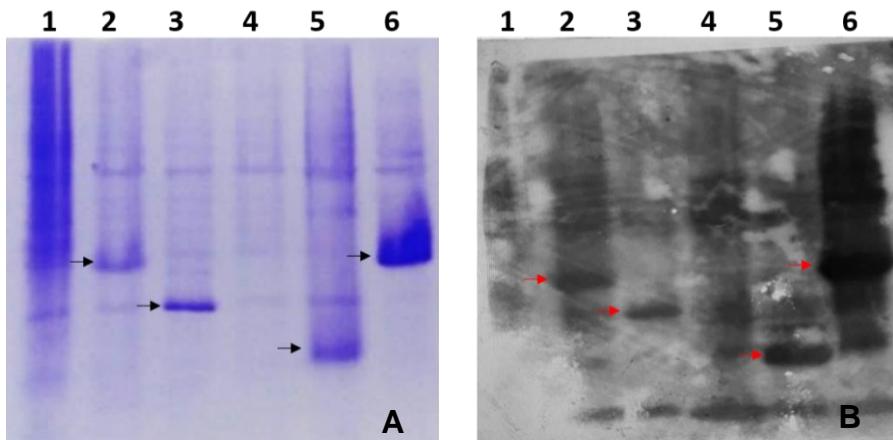


Figura 1. SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) para caracterização da quimera Bc-Ac. 1- Cultivo de *E. coli* antes da indução; 2- *E. coli* expressando rCPA integra (45 kDa); 3- *E. coli* expressando rCPB integra (36 kDa); 4- *E. coli* expressando rCPA-C (17 kDa); 5- *E. coli* expressando rCPB-C (22 kDa); 6- *E. coli* expressando Bc-Ac (36,4 kDa).

A quimera rBc-Ac mostrou ser antigênica, reconhecida por soro padrão de equino vacinado com o sobrenadante do cultivo de *C. perfringens* tipo C (Figura 1B). Além disso, a quimera foi reconhecida pelo soro de ovelhas e coelhos vacinados com os toxóides convencionais de CPA e CPB de *C. perfringens* (dados não demonstrados).

4. CONCLUSÕES

A produção em um único bioprocesso, sem a necessidade de expressão dos抗ígenos individuais, de uma quimera recombinante bivalente antigênica, torna a rBc-Ac um promissor alvo para utilização na imunização passiva de animais neonatos. A perspectiva desse estudo é validar essa molécula como antígeno vacinal seguindo a legislação estabelecida pelo Ministério da Agricultura Pecuária de Abastecimento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Lobato, F.; Salvarani, F.; Gonçalves, L.; Pires, P.; Silva, R.; Alves, G.; Pereira, P. Clostríos dos animais de produção. **Veterinaria E Zootecnia**, Belo Horizonte, v.20, p.29–48, 2013.

Zeng, J.; Deng, G.; Wang, J.; Zhou, J.; Liu, X.; Xie, Q.; & Wang, Y. Potential protective immunogenicity of recombinant *Clostridium perfringens* ??-??2-??1 fusion toxin in mice, sows and cows. **Vaccine**, Yinchuan, v.29, n.33, p. 5459–5466, 2011.

Uzal, F. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. **Anaerobe**, v.10, p. 135-143, 2004.

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

Sakurai, J.; Nagahama, M.; & Oda, M. *Clostridium perfringens* alpha-toxin: characterization and mode of action. **Journal of Biochemistry**, v.136, n.5, p. 569–74, 2004.

Shreya, D.; Majumder, S.; Kingston, J.J.; Batra, H.V. Generation and characterization of recombinant bivalent fusion protein r-Cpib for immunotherapy against *Clostridium perfringens* beta and iota toxemia. **Mol. Immunol**, v.70, p. 140–148, 2016.

Sakurai, J., & Duncan, C. Some properties of beta-toxin produced by *Clostridium perfringens* type C. **Infection and Immunity**, v.21, n.2, p. 678–80, 1978.

Milach, A.; de los Santos, J. R. G.; Turnes, C. G.; Moreira, Â. N.; de Assis, R. A.; Salvarani, F. M.; Conceição, F. R. Production and characterization of *Clostridium perfringens* recombinant β toxoid. **Anaerobe**, Pelotas, v.18, n.3, p. 363–365, 2012.

Langrouri, R.P.; Shamsara, M.; Aghaiypour, K. Expression of *Clostridium perfringens* epsilon-beta fusion toxin gene in *E. coli* and its immunologic studies in mouse. **Vaccine**, v.31, p. 3295–3299, 2013.

Vidal, J.E.; Ohtani, K.; Shimizu, T.; McClane, BA. Contact with enterocyte-like Caco-2 cells induces rapid upregulation of toxin production by *Clostridium perfringens* type C isolates. **Cell microbial**, v.11, p. 363-369, 2009.

Sambrook, J. & Russel, D.W. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Salvarani, F.M.; Conceição, F.R.; Cunha, C.E.; Moreira, G.M.; Pires, P.S.; Silva, R.O.; Alves, G.G.; Lobato, F.C. Vaccination with recombinant *Clostridium perfringens* toxoids α and β promotes elevated antepartum and passive humoral immunity in swine. **Vaccine**, v.31, n.38, p. 4152-4155, 2013.

Cruz Junior, E.C.; Salvarani, F.M.; Silva, R.O.S.; Silva, M.X.; Lobato, F.C.F.; Guedes, R.M.C. A surveillance of enteropathogens in piglets from birth to seven days of age in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.8, p. 963-969, 2013.