

AVALIAÇÃO DA ANTIGENICIDADE DE UM FRAGMENTO DA TOXINA ÉPSILON RECOMBINANTE DE *Clostridium perfringens*

RAFAEL AMARAL DONASSOLO¹; MARCOS ROBERTO ALVES
FERREIRA; FRANCISCO DENIS DOS SANTOS, EMILI GRIEP; RAFAEL
RODRIGUES RODRIGUES; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas- rafaeldonassolo@hotmail.com

Universidade Federal de Pelotas- marcosferreiravet@gmail.com

Universidade Federal de Pelotas- denis.santos195@gmail.com

Universidade Federal de Pelotas- emiliigriep@gmail.com

Universidade Federal de Pelotas- rafaelr458@gmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

A toxina épsilon de *Clostridium perfringens* (ETX) é considerada a terceira toxina microbiana mais potente (FERREIRA et al., 2016). A ETX é produzida pelos toxinotipos B e D sendo uma protoxina ativada por clivagem proteolítica dos peptídeos amino e carboxi-terminal (GIL et al., 2015). Seu mecanismo de ação é principalmente caracterizado pela formação de poros na membrana das células do hospedeiro (GIL et al., 2015). Esta toxina está relacionada principalmente a enterotoxemia de ovinos e os animais acometidos por esta doença morrem poucas horas após o início dos sinais clínicos, o que impossibilita a adoção de medidas terapêuticas (PETIT et al., 1999).

Vacinas recombinantes têm se mostrado como uma eficiente medida preventiva nessa problemática (MOREIRA et al., 2016; FERREIRA et al., 2016). Diversos estudos envolvendo a produção de vacinas através de engenharia genética contra toxinas de *Clostridium spp.* já foram desenvolvidos utilizando proteínas inteiras ou partes delas consideradas imunogênicas e os resultados apresentados são satisfatórios (MOREIRA JR, et al., 2016; OTAKA et al., 2017). No entanto, um dos maiores entraves na produção de vacinas contra ETX é sua toxicidade no hospedeiro (FERREIRA et al., 2016). Por isso, o foco dos estudos acerca desta toxina visa a eliminação desta toxicidade através da utilização de partes atóxicas ou pela construção de quimeras constituídas de domínios mais imunogênicos, direcionando a resposta imune (ALVES et al., 2016).

ALVES et al., (2017) identificaram através de soro de animais imunizados com toxoides de ETX, dois peptídeos de ETX mais antigênicos, considerados potenciais alvos para formulação de vacinas de subunidade atóxicas, uma vez que são mais facilmente reconhecidos por anticorpos neutralizantes, impedindo sua ação. Neste estudo, utilizamos estes dois peptídeos fusionados (rETX^h 1.2.) e avaliamos sua antigenicidade frente a anticorpos de cordeiros vacinados com a ETX recombinante e toxoide convencional através de ELISA.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção da proteína recombinante

Para a clonagem, as duas regiões codificadoras dos peptídeos antigênicos de ETX foram fusionadas *in silico*, sintetizadas e clonadas no vetor de expressão pET28a. O vetor recombinante foi utilizado para transformar por choque térmico cepas *Escherichia coli* BL21 (DE3) RIL™. O pré-inóculo de 50 ml de LB acrescido de 100 µg/mL de canamicina (37 °C, 18 h, 200 rpm) foi transferido para frascos erlenmeyer contendo 450 ml de LB e mantido a 37 °C, 200 rpm até atingir a densidade ótica a 600 nm (D.O.₆₀₀) de 0,6 - 0,8 quando a expressão foi induzida com 0,5 mM IPTG por 3 h nas mesmas condições. Posteriormente, o cultivo foi centrifugado (7000 rpm, 10 min, 4 °C) e o *pellet* foi suspenso em 25 ml de tampão de lavagem contendo 100 µg/ml de lisozima e incubado por 1 h a 37 °C, a 200 rpm. Posteriormente, o cultivo foi novamente centrifugado e o sobrenadante da lise foi armazenado para posterior purificação das proteínas. A purificação das proteínas recombinantes deu-se através de colunas de cromatografia de afinidade por níquel HisTrap HP. A caracterização das proteínas foi realizada por SDS-PAGE e *Western Blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-His6x.

2.2 Avaliação da antigenicidade da toxina através de ELISA

O ELISA indireto foi usado para avaliar antigenicidade de rETXh1.2. frente aos soros de ovelhas vacinadas com ETX recombinante (Moreira et al. 2016). Placas de 96 poços (Nunc-Immuno Micro Well MaxiSorp) foram revestidas com 100 ng/poço de rETXh1.2. em tampão carbonato-bicarbonato (TCB) pH 9,6 (18 h, 4 °C). As placas foram lavadas três vezes com PBS-T entre cada passo. As incubações pós-sensibilização foram realizadas por 1 h a 37 °C em um volume final de 100 µL/poço. As placas foram bloqueadas com leite em pó desnatado a 5% em PBS-T. As amostras de soro foram diluídas numa razão de 1:800 em PBS-T e adicionadas à placa em duplicata. O conjugado anti IgG de ovelha conjugado com peroxidase foi diluído na razão de 1:5.000 e adicionado à placa. A reação foi revelada usando Orto-fenilenodiamina (OPD; Sigma-Aldrich), tampão citrato-fosfato 0,2 M (TPS), pH 4,0 e H₂O₂ a 0,02%. As placas foram incubadas durante 15 min à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, e a D.O._{492 nm} foi mensurada utilizando o leitor de microplacas Biochrom EZ Read 400.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rETXh1.2. (11 kDa) pode ser observado no gel de poliacrilamida SDS PAGE 12% e WB, após a purificação, representando o sucesso da expressão e purificação da ETX (Figura 1).

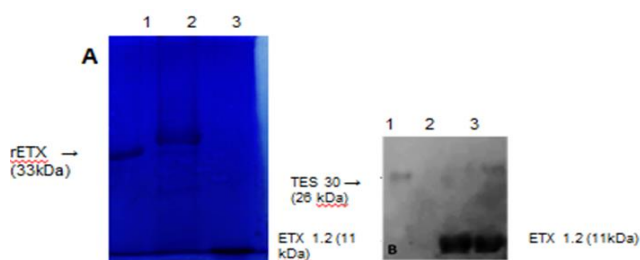


Figura 1 – SDS-PAGE e WB de hETX1.2 (11 kDa) – (A) SDS-PAGE da expressão de rETXh1.2 em *Escherichia coli* BL21 (DE3) Ril. 1 – *E. coli* BL21 (DE3) Ril pET28aetx; 2 – *E. coli* BL21 (DE3) Ril pET28aetxbb; 3 – *E. coli* BL21 (DE3) Ril pET28ahETX1.2 (B) WB de rETXh1.2. 1 – rTes30 purificada (26 kDa); 2 e 3 – rETXh1.2 purificada (11 kDa).

A avaliação da antigenicidade do domínio de rETXh1.2 por ELISA através da utilização de soros de ovinos vacinados contra a toxina inteira estão representados na Tabela 1. Os resultados demonstram que os anticorpos presentes no soro dos 7 animais vacinados foram capazes de reconhecer a versão inteira (controle positivo), no entanto, em relação ao peptídeo 1.2 somente os anticorpos presentes no soro de um destes animais foi capaz de reconhecê-lo.

Tabela 1: Níveis de anticorpos (D.O._{492nm}) anti-ETX no soro dos ovinos vacinados com rETX e toxóide convencional.

Ovinos	Soro Toxóide		Soro rETX	
	rETX	rETXh1.2.	rETX	rETXh1.2.
Animal 1	1,024	0,042	1,353	0,024
Animal 2	0,987	0,055	1,202	0,068
Animal 3	1,1	0,043	1,181	0,075
Animal 4	0,721	0,023	1,126	0,050
Animal 5	0,817	0,023	1,262	0,087
Animal 6	1,194	0,525	1,024	0,287
Animal 7	0,522	0,035	0,895	0,091
Média	0,9092	0,106	1,149	0,097

Segundo ALVES et al (2014), o domínio 1 de ETX, localizado na região amino-terminal, é o responsável pela interação da toxina com a célula do hospedeiro sendo crucial para resposta imune. Neste estudo, usamos dois peptídeos deste domínio que foram reconhecidos por soros de animais imunizados com toxoide de ETX de *C. perfringens*, considerados, portanto, antigênicos. No entanto, em relação aos nossos resultados estes peptídeos demonstraram não ser antigênicos aos anticorpos presentes no soro de ovinos vacinados contra ETX isto provavelmente deve-se a conformação tridimensional do peptídeo. Um novo experimento deve ser realizado a fim de avaliar a reação dos soros de ovinos vacinados com rETXh 1.2. frente a proteína rETX inteira, e o título de anticorpos neutralizantes anti-ETX será determinado por soroneutralização em camundongos.

4. CONCLUSÃO

O peptídeo sintético rETXh 1.2. foi reconhecido pelo soro de um ovino vacinado com rETX e um ovino vacinado com toxoide de ETX de *C. perfringens*, demonstrando a antigenicidade desse antígeno. Entretanto, seu potencial como imunógeno ainda deve ser avaliado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Gil, C., Dorca, J. A, Blasi, J. (2015). Clostridium Perfringens Epsilon Toxin Binds to Membrane Lipids and Its Cytotoxic Action Depends on Sulfatide. **Plos one**, 10, 1-19. doi.org/10.1371/journal.pone.0140321
- 2- Ferreira, M.R.A., Moreira, G.M.S.G., Cunha, C.E. P. Mendonça, M., Salvarani, F. M., Conceição, F.R. (2016). Clostridium perfringens: Production Strategies and Applications as Veterinary Vaccines. **Toxins**, 2, 1–24. <https://doi.org/10.3390/toxins8110340>
- 3- Moreira, C.; da Cunha, C.E.P.; Moreira, G.M.S.G.; Mendonça, M.; Salvarani, F.M.; Moreira, Â.N.; Conceição, F.R. (2016). Protective potential of recombinant non-purified botulinum neurotoxin serotypes C and D. **Anaerobe**, Amsterdam, 40, 58–62;
- 4- Otaka, D.Y.; Barbosa, J.D.; Moreira Jr, C.; Ferreira, M.R.A.; Cunha, C.E.P.; Brito, A.R.S.; Donassolo, R.A.; Moreira, A.N.; Conceição, F.R.; Salvarani, F.M. (2017) Humoral Response of Buffaloes to a Recombinant Vaccine against Botulism Serotypes C and D. **Toxins**, 9, 297.
- 5- Alves G.G., Machado R.A., Olortegui C.D., Lobato F.C.F. (2014) *Clostridium perfringens* epsilon toxin: the third most potent bacterial toxin known. **Anaerobe**. 30:4589–4601.
- 6- Alves G, G., Machado R. A., Olórtégui, C. D., Silva, R.O.S., Lobato, F.C.F (2017). Mapping of the continuous epitopes displayed on the Clostridium perfringens type D epsilon-toxin. **Brazilian Journal of Microbiology**. 214. 1–6.
- 7- Moreira, G.M.S.G.; Salvarani, F.M.; Cunha, C.E.P.; Mendonça, M.; Moreira, A.N.; Gonçalves, L.A.; Pires, P.S.; Lobato, F.C.F.; Conceição, F.R (2016). Immunogenicity of a trivalent recombinant vaccine against Clostridium perfringens alpha, beta, and epsilon toxins in farm ruminants. **Sci. Rep.** 6.
- 8- Petit, L., Gibert, M., & Popoff, M. (1999). *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. **Trends in Microbiology**, 7(3), 104–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10203838>