

AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA da BACTERINA DE *Escherichia coli* EXPRESSANDO A PROTEÍNA RECOMBINANTE CP01850 DE *Corynebacterium pseudotuberculosis*

GABRIEL BRENNER¹; RODRIGO BARROS DE PINHO²; MARA THAIS DE
OLIVEIRA SILVA²; NICOLE RAMOS SCHOLL¹; LUIZA DOMINGUES MORON¹;
SIBELE BORSUK⁶

¹Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas -
gabrielbrenner123@gmail.com, nicoleramosscholl@hotmail.com,
luizabiotec99@gmail.com

²Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas -
rodrigobpinho@hotmail.com, marathaisos@gmail.com

³Centro de Desenvolvimento Tecnológico - sibeleborsuk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria gram-positiva, intracelular facultativa, e o agente etiológico da linfadenite caseosa (LC) (FILGUEIRA et al., 2010; de SÁ GUIMARÃES et al., 2011).

A LC é uma doença infectocontagiosa (TIWARI et al., 2014; SANTAROSA et al., 2015) caracterizada pelo desenvolvimento de abscessos nos gânglios linfáticos superficiais e tecido subcutâneo (LC externa) ou nos gânglios linfáticos de órgãos internos (LC interna) (DORELLA et al., 2009; PATON et al., 2003). Esta enfermidade possui grande importância econômica devido às perdas causadas pela redução no ganho de peso dos animais, na produção de leite e lã, além da condenação da carcaça devido as lesões geradas pelos (D'AFONSECA et al., 2008).

Uma vez que os tratamentos disponíveis para LC são onerosos e ineficazes, a profilaxia através de vacinas torna-se a melhor alternativa de controle da enfermidade. Entretanto, as vacinas disponíveis possuem baixa eficácia e proteção, necessitando de mais de uma dose em conjunto com *boosts* anuais (GUIMARÃES et al., 2011). Desta forma, faz-se necessária a busca por novos alvos e formulações vacinais. Neste contexto, a utilização de bacterinas de *Escherichia coli* expressando a proteína recombinante CP01850 de *C. pseudotuberculosis* para utilização em vacinas é interessante devido a seu baixo custo, por dispensar etapas de purificação, além de aliar vantagens da produção de vacinas recombinantes, como segurança e previsibilidade do alvo (PACE et al., 1998). rCP01850 é uma fosfatase ácida com 410 aminoácidos apontada como um dos principais alvos para desenvolvimento de vacinas para a LC, por apresentar uma alta densidade de epítomos maduros, porções da proteína que podem ser reconhecidas pelo MHC I e gerar resposta imune, e demonstrou alta sensibilidade quando utilizada em testes de imunodiagnóstico (REZENDE et al., 2016).

Desta forma a utilização de uma bacterina de *E. coli* expressando a proteína rCP01850 de *C. pseudotuberculosis* em vacinas para LC torna-se interessante devido ao baixo custo e pelo seu potencial imunogênico.

2. METODOLOGIA

Para a produção da bacterina de *E. coli* expressando rCP01850 foi realizada a transformação de cepas de *E. coli* DE3 BL21 Star com o plasmídeo

pAE/CP01850 previamente construído, e uma colônia foi selecionada para iniciar o pré-inóculo em 50 mL de LB líquido com adição de ampicilina. Este foi incubado a 37 °C *overnight* sob agitação. A partir deste pré-inóculo, foi realizado um aumento de escala e o cultivo incubado novamente a 37 °C até atingir uma DO₆₀₀ entre 0,4 a 0,6. Foram adicionados 500 µL de IPTG 1M para indução da expressão proteica durante 3 h. Um cultivo de *E. coli* transformada apenas com o plasmídeo pAE também passou pelos mesmos processos de aumento de escala e indução.

Após o tempo de indução foram coletadas 5 alíquotas de 1 mL de ambos os cultivos. Estas alíquotas foram utilizadas para análise de expressão, concentração celular (UFC/mL) e quantificação proteica. A quantificação da proteína rCP01850 foi feita através de SDS-PAGE com curva de BSA, e um western blot utilizando anticorpo monoclonal anti-6xhistidina foi realizado para confirmar a identidade da proteína. Os cultivos induzidos foram centrifugados a 7000 g por 10 min e o *pellet* foi ressuscitado em 50 mL de PBS estéril com adição de 0,2% v/v de formaldeído para a inativação da bactéria por 16 h a 37 °C, sob agitação. Decorrido este tempo, foram realizadas três lavagens com PBS estéril, seguidas de centrifugação a 7000 g por 10 min para a remoção do formaldeído. Ao final, o *pellet* foi eluído em 30 mL de PBS estéril. Para confirmar o sucesso da inativação 100 µL das bacterinas foram plaqueadas em meio LB sólido e incubadas a 37 °C em estufa por 16-18 h

Análises de segurança foram realizadas para confirmar a estabilidade da inativação. Para isso foram realizados os seguintes testes: transformação de uma cepa de *E. coli* DH5α utilizando o plasmídeo extraído da bacterina *E. coli*/CP01850 com posterior plaqueamento em LB sólido com ampicilina para demonstrar a inativação do gene de resistência; e incubação de uma alíquota da bacterina em shaker a 37 °C durante 30 dias para confirmar a estabilidade da inativação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

E. coli recombinante expressou a proteína rCP01850 na concentração de 600 µg/mL (**Figura 1**). A expressão foi comprovada através de SDS-PAGE demonstrando a proteína no peso aproximado de 35 kDa. Através de diluição seriada a concentração celular da bacterina foi identificada como x UFC/mL.

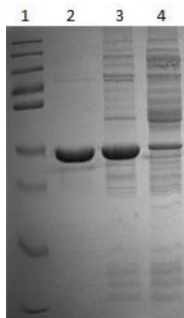


Figura 1: SDS-PAGE para avaliação da expressão da proteína rCP01850 em *E. coli*. (1) marcador de peso molecular (2) rCP01850 purificada (3) *E. coli*/CP01850 (4) *E. coli* não transformada

A identidade da proteína recombinante foi confirmada por Western blot utilizando anticorpo monoclonal anti-6xhistidina (**Figura 2**), na qual foi possível observar uma banda reativa no tamanho esperado de 35 kDa, tanto para a

proteína recombinante purificada (utilizada como controle) quanto para a bacterina expressando esta proteína.



Figura 2: Western blot utilizando anticorpo monoclonal anti-histidina. (1) marcador pré-corado (2) proteína rCP01850 purificada (3) *E. coli*/CP01850 (4) *E.coli* não transformada

Após inativação da bacterina com formaldeído 0,2% e plaqueamento de 100 µL do cultivo inativado não foi observado o crescimento de nenhuma colônia, confirmando o sucesso da inativação. O plasmídeo pAE/CP01850 foi extraído da bacterina *E. coli*/CP01850 inativada e submetido a uma eletroforese em gel de agarose (**Figura 3**). Nenhuma banda foi observada, demonstrando que este perdeu sua conformação. O mesmo foi utilizado para transformação de uma cepa de *E. coli* DH5α e o produto foi plaqueado em LB sólido contendo ampicilina. Não houve crescimento de nenhuma colônia no meio contendo antibiótico, o que indica que a inativação do gene de resistência também ocorreu com sucesso. A alíquota da bacterina que foi incubada durante 30 dias também foi plaqueada após este período, e o crescimento de colônias não foi observado, demonstrando a estabilidade da inativação da bacterina (**Figura 4**).

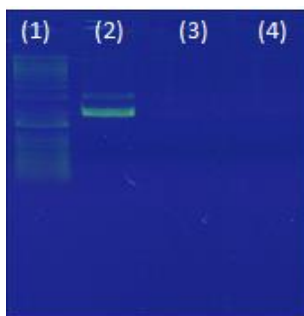


Figura 3: Gel de agarose 1% contendo o produto da extração plasmidial. (1) marcador de peso molecular 1kb Plus (invitrogen) (2) plasmídeo pAE-controle (3) Plasmídeo extraído da bacterina *E. coli*/pAE (4) plasmídeo extraído da bacterina *E. coli*/CP01850

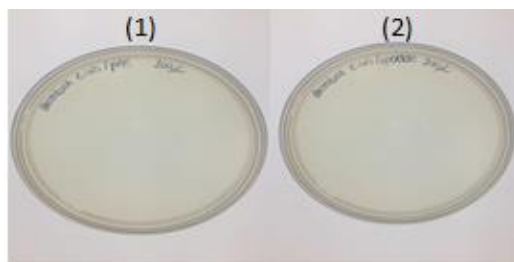


Figura 4: Confirmação da inativação das bacterinas recombinantes. (1) Bacterina *E. coli*/pAE; (2) Bacterina *E. coli*/CP01850.

4. CONCLUSÕES

O estudo demonstrou que a bacterina expressando a proteína rCP01850 foi obtida com sucesso e obteve bons resultados em testes de segurança, mostrando-se promissora para a avaliação em formulações vacinais em modelo murino.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

D'AFONSECA, V. et al. A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. *Genet Mol Res*, v. 7, p. 252-260, 2008.

DORELLA, F. A et al. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. *Expert review of vaccines*, v. 8, n. 2, p. 205–213, 2009.

FILGUEIRA, K.D., DE PAULA, V.V., BATISTA, J.S. & FEIJÓ, F.M.C. (2010). Piodermite profunda por *Corynebacterium pseudotuberculosis* EM CUTIA (*Dasyprocta* sp.). *Ciência Animal Brasileira*. 11(2). p. 461–464.

DE SÁ GUIMARÃES, A., DO CARMO, F.B., PAULETTI, R.B., SEYFFERT, N., RIBEIRO, D., LAGE, A.P., HEINEMANN, M.B., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V. & GUIMARÃES GOUVEIA, A.M. (2011). Caseous lymphadenitis: Epidemiology, diagnosis, and control. *IIOAB Journal*. 2(2). p. 33–43.

PACE, J. L. et al. Inactivated whole-cell bacterial vaccines: Current status and novel strategies. *Vaccine*, v. 16, n. 16, p. 1563–1574, 1998.

PATON, M. W. et al. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Australian veterinary journal*, v. 81, n. 1–2, p. 91–95, 2003.

SANTAROSA, B.P., DANTAS, G.N., AMORIM, R.L., CHIACCHIO, S.B., OLIVEIRA-FILHO, J.P., AMORIM, R.M., RIBEIRO, M.G. & GONÇALVES, R.C. (2015). Meningoencefalite supurativa por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em cabra com linfadenite caseosa: relato de caso. *Veterinária e Zootecnia*. 21(4). p. 537–542.

REZENDE, ANDREA S. et al. In silico identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigenic targets and application in immunodiagnosis. *Journal of Medical Microbiology*, v. 65, n.6, p. 521-529, 2016.

TIWARI, S., DA COSTA, M.P., ALMEIDA, S., HASSAN, S.S., JAMAL, S.B., OLIVEIRA, A., FOLADOR, E.L., ROCHA, F., DE ABREU, V.A.C., DORELLA, F., HIRATA, R., DE OLIVEIRA, D.M., DA SILVA TEIXEIRA, M.F., SILVA, A., BARH, D. & AZEVEDO, V. (2014). *C. pseudotuberculosis* Phop confers virulence and may be targeted by natural compounds. *Integr. Biol.* 6(11). p. 1088–1099. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4IB00140K>