

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA QUIMERA BIVALENTES DAS TOXINAS CPB E ETX DE *Clostridium perfringens*

FERNANDA SILVA CARNEIRO¹; RAFAEL RODRIGUES RODRIGUES²;
RAFAEL AMARAL DONASSOLO³; MARCOS ROBERTO ALVES FERREIRA⁴;
FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO⁵.

¹Universidade Federal de Pelotas – fernandacarneiro.sc@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – rafaelr458@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – rafaeldonassolo@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – marcosferreiravet@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Clostridium perfringens é uma bactéria bacilar anaeróbia, gram-positiva e produtora de endósporos, que está presente na microbiota gastrointestinal de humanos e animais (SMEDLEY, 2004). É amplamente distribuída no ambiente e possui alta variabilidade genética e, por isso, é capaz de expressar diferentes toxinas e enzimas que medeiam o desencadeamento de uma série de doenças (ROOD, 2018; UZAL, 2014). O *C. perfringens* expressa mais de 17 toxinas que são responsáveis por classificar sete toxinotipos (A-G) (ROOD, 2018).

As infecções em ruminantes atribuídas as clostrídioses, especialmente as causadas por *C. perfringens*, são responsáveis por importantes perdas econômicas devido ao seu rápido desenvolvimento e alta taxa de mortalidade (LOBATO, 2013; UZAL, 2014). Dentre as toxinas expressas, duas destacam-se devido sua alta toxicidade e letalidade, sendo elas a toxina beta (CPB) e toxina épsilon (ETX) (ALVES, 2014; FERREIRA, 2016; UZAL, 2014). As toxinas CPB e ETX são importantes fatores de patogenicidade dos toxinotipos B, C e D, onde são responsáveis pelo desenvolvimento de doenças como enterotoxemia, enterite necrótica e enterite necro-hemorrágica, responsáveis pela formação de poros na membrana e causar o efeito citotóxico celular (KIU, 2018; KAUSHIK, 2019). Tais doenças possuem rápido desenvolvimento, devido a morte celular e necrose tecidual, além de serem facilmente absorvidas para o sistema circulatório e/ou nervoso, desencadeando em um desfecho frequentemente fatal (ALVES, 2014; FERNANDEZ-MIYAKAWA, 2007; KIU, 2018).

As vacinas disponíveis atualmente contra *C. perfringens* são do tipo toxóides. Ainda que sejam eficientes na indução da resposta imune, apresentam implicações quanto ao risco biológico atribuído, estabilidade, formaldeído residual e reversão da toxicidade (SONG, 2019). A fim de produzir uma vacina de alto rendimento em sistemas de expressão bacterianos não patogênicos, o presente trabalho objetiva a caracterização e avaliação da antigenicidade de quimera bivalente compostas pelas toxinas CPB (porção C-terminal) e ETX, agora denominada BE, em *Escherichia coli*.

2. METODOLOGIA

2.1. Síntese, expressão e purificação da proteína recombinante

As regiões codificadoras dos抗ígenos da porção C-terminal de CPB e ETX foram fusionadas in silico, sintetizadas e clonadas no vetor de expressão pET28a. Foi realizada a transformação por choque térmico em cepas *E. coli* BL21 (DE3) Star . Posteriormente, os cultivos foram realizados em inóculos de 50 mL de meio

LB suplementado com 100 µg/mL de canamicina (37°C, 18h, 200 rpm), onde foram transferidos para 450 mL de meio LB nas mesmas condições já descritas (37 °C, 200 rpm) até atingir a densidade ótica DO_{600nm} de 0,8, e então induzidas com 0,5 mM IPTG por 3h nas mesmas condições. Posteriormente, o cultivo foi centrifugado (7000 × g, 10 min, 4°C) e o pellet foi suspenso em 25 mL de tampão de lavagem (0,234% de NaH₂PO₄, 2,92% de NaCl e 0,068% de Imidazole) com 100 µg/mL de lisozima para a lise celular (37 °C, 1h, 200 rpm). Posteriormente, foi feita a sonicação do cultivo (60 Hz, 6 ciclos, 30 seg) e novamente centrifugado. Ao pellet foi adicionado 1 mL de tampão de lavagem com ureia 6M. 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 por Western blot

As amostras purificadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% com controles com amostras de CPB e ETX purificadas (já previamente caracterizadas), e posteriormente transferidas para três membranas de nitrocelulose em tampão de transferência (1h, 100 V) e um gel corado com Comassie Blue. Em seguida, duas das membranas foram incubadas com soros produzidos em camundongos (anti-CPB) e ovelha (anti-ETX), sendo essas a membrana B e membrana C, respectivamente (figura 1). Estas foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários anti-ovelha e anti-camundongos (4h, 28°C, 180 rpm). Outra membrana foi incubada (1h, 28°C, 180 rpm) com anticorpos anti-histidina, sendo esta a membrana A (figura 1). A reação antígeno-anticorpo foi revelada através da solução de revelação (9 mL de tampão Tris-HCl pH 7,6, 1 mL de solução de níquel 0,3%, 0,006 g de DAB e 10 uL de água oxigenada).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise por WB revelou que a quimera foi reconhecida pelos respectivos soros (anti-ETX, anti-CPB e anti-histidina), reconhecida pelo padrão de banda de tamanho esperado, assim como os controles reconhecidos (figura 1).

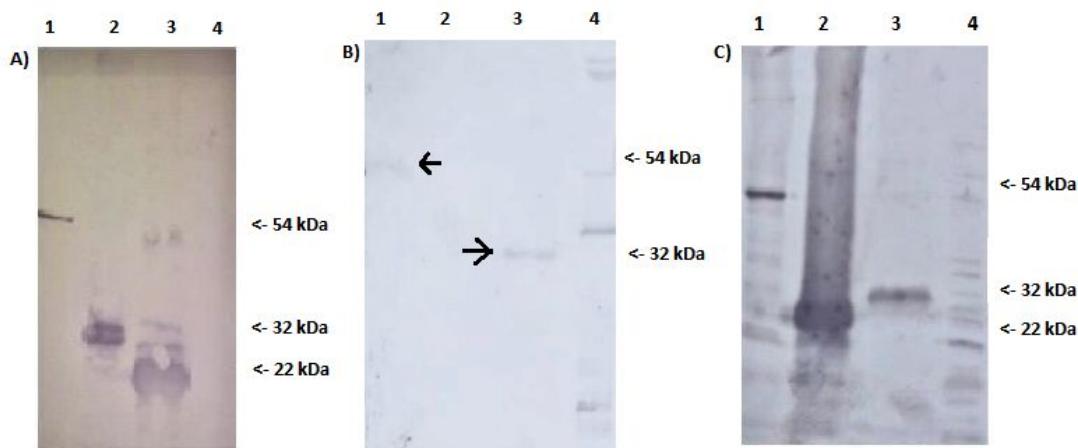


Figura 4. Avaliação da antigenicidade da quimera BE pela técnica de Western blot. 1- Quimera BE (~54 kDa). 2- rCPB-C (~22 kDa). 3- rETX (~32 kDa). 4- Controle negativo (extrato de *E. coli*). (A) Anticorpo monoclonal anti-His6x; (B) Soro murino monovalente anti-ETX; (C) Soro ovino monovalente anti-CPB-C.

O reconhecimento da quimera BE pelos soros anti-CPB e anti-ETX, assim como os controles, comprovam sua antigenicidade. Contudo, a utilização de soro ovino (anti-CPB) pode ter resultado em reações cruzadas, uma vez que o animal está em constante contato com o ambiente ou ter sofrido uma vacinação não relatada e por isso, pode ter contato com outros抗ígenos do organismo, visto que o anticorpo anti-CPB também foi capaz de reconhecer o抗ígeno ETX como apresentado na membrana C (figura 1). A produção de toxinas em forma de quimeras recombinantes possibilita então a produção de mais de uma toxina em um único bioprocesso, mantendo as características de alta expressão, maior estabilidade, menor custo e tempo, reduzindo assim o número de etapas de expressão, quando comparados com o método convencional (FERREIRA, 2019; CARNEIRO, 2019). A síntese de uma quimera recombinante CPB-ETX, além de apresentar as vantagens da produção de抗ígenos em forma de quimera, é atóxica, o que facilita a manipulação e causa danos significativamente menores que vacinas tradicionais (UZAL et al, 2014).

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A quimera recombinante BE foi reconhecida pelos soros murinos e ovinos, e portanto, demonstrando sua antigenicidade frente a um soro animal. No entanto, deverão ser feitas novas análises para averiguar a antigenicidade da proteína frente a soros monovalentes, assim como avaliar a antigenicidade através da técnica de ELISA, para uma melhor caracterização.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, G. G., ÁVILA, R. A. M., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. D. & LOBATO, F. C. F. Clostridium perfringens epsilon toxin: The third most potent bacterial toxin known. *Anaerobe*, 30, p. 102-107, 2014.
- CARNEIRO, F. S., RODRIGUES, R. R., DONASSOLO, R. A., CABALLERO, P. S., FERREIRA, M. R. A., CONCEIÇÃO, F. R. Caracterização de quimeras bivalentes e trivalentes das toxinas cpa, cpb e etx de Clostridium perfringens. CONGRESSO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA, 2019, Pelotas. Anais 2019. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas. P. 1-4.
- FERNANDEZ-MIYAKAWA, M. E., FISHER, D. J., POON, R., SAYEED, S., ADAMS, V., ROOD, J. I., MCCLANE, B. A., UZAL, J. I. Both epsilon-toxin and beta-toxin are important for the lethal properties of Clostridium perfringens type B isolates in the mouse intravenous injection model. *Infection and Immunity*, v. 75, n. 3, p. 1443-1452, 2007.
- FERREIRA, M. R. A., MOREIRA, G. M. S. CUNHA, C. E. P., MENDONÇA, M., SALVARANI, F. M. MOREIRA, A. N., CONCEIÇÃO, F. R. Recombinant Alpha, Beta and Epsilon Toxins of Clostridium perfringens: Production Strategies and Application as Veterinary Vaccines. *Toxins*, v. 8, n. 340, 2016.
- FERREIRA, M. R., MOTTA, J. F., AZEVEDO, M. L., SANTOS, L. M., MOREIRA JR., C., RODRIGUES, R. R., DONASSOLO, R. A., REIS, A. S. B., BARBOSA, J. D., SALVARANI, F. M., MOREIRA, A. N., CONCEIÇÃO, F. R. Inactivated recombinant Escherichia coli as a candidate vaccine against Clostridium perfringens alpha toxin in sheep. *Anaerobe*, v. 59, p. 163-166, 2019.
- KIU, R., HALL, L. J. An update on the human and animal enteric pathogen Clostridium perfringens. *Emerging Microbes & Infections*, v. 7, n. 141, 2018.

- LOBATO, F. C. F., SALVARANI, F. M., GONÇALVES, L. A., PIRES, P. S., SILVA, R. O. S., ALVES, G. G., OLIVEIRA JR, C. A. & PEREIRA, P. L. L. Clostridioses dos Animais de Produção. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, p. 29-48, 2013.
- ROOD, J. I., ADAMS, V., LACEY, J., LYRAS, D., MCCLANE, B. A., MELVILLE, S. B., MOORE, R. J., POPOFF, M. R., SARKER, M. R., SONGER, J. G., UZAL, F. A., IMMERSEEL, F. V. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxins-based typing scheme. **Anaerobe**, v. 53, p. 5-10, 2018.
- 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. Immunogenicity of a trivalent recombinant vaccine against *Clostridium perfringens* alpha, beta and epsilon toxins in farm ruminants. **Scientific Reports**, 2016.
- SHETTY, R. P., ENDY, D. & KNIGHT, T. F. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. **Journal of Biological Engineering**, v. 5, 2008.
- SHRESTHA, A., UZAL, F. A., MCCLANE, B. A. Enterotoxic Clostridia: *Clostridium perfringens* enteric diseases. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 5, 2017.
- SMEDLEY, J. G., FISHER, D. J., SAYEED, S., CHAKRABARTI, G., MCCLANE, B. A. The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 152, p. 183-204, 2004.
- SONG, X., SUN, Y., LIU, Y., ZHANG, C., YANG, L. & WANG, C. Expression and Purification of Multi-toxin Fusion Protein of *Clostridium perfringens* and the Preparation of Genetically Engineered Multivalent Subunit Vaccine. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 3, p. 231-236, 2019.
- UZAL, F. A., FREEDMAN, J. C., SHRESTHA, A., THEORET, J. R., GARCIA, J., AWAD, M. M., ADAMS, V., MOORE, R. J., ROOD, J. I., MCCLANE, B. A. Toward an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. **Future Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 361-377, 2014.