

ESTABELECIMENTO DE CONDIÇÕES ÓTIMAS DE SOLUBILIZAÇÃO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE DESTINADA A FORMULAÇÃO VACINAL CONTRA ENTERITE NECRÓTICA AVIÁRIA

ISABELA ORTIZ DE TUNES RAMOS¹; GUILHERME FEIJÓ DE SOUSA²;
AMILTON CLAIR PINTO SEIXAS NETO³; CAMILA GARCIA DE SOUZA⁴;
THALITA COLLARES ALVES⁵; LUCIANO DA SILVA PINTO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – ortizrisabela@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – guima.sousa07@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - amiltonseixas@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – kaka.garcia.2010@outlook.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – thalita.collares.alves@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – ls_pinto@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A enterite necrótica aviária (ENA) é uma doença de extrema importância econômica, a qual é causada pela bactéria *Clostridium perfringens*. Essa bactéria compromete o trato gastrointestinal de aves através de toxinas, resultando na redução da produtividade das aves ou, em casos mais graves, há perda significativa do rebanho. Uma das formas de controle da doença é o uso de antibióticos, porém tal prática exige cuidados e preocupações, devido, principalmente, ao uso indiscriminado, resultando no aumento da resistência a antibióticos em patógenos humanos (WILDE S, et al., 2019). Nesse contexto, a vacinação dos animais é uma alternativa em relação ao uso dos antibióticos para o melhor controle da doença (YUAN, B., et al., 2022).

Para o desenvolvimento de vacinas, os adjuvantes possuem um papel muito significativo, pois são substâncias que, quando adicionadas na formulação vacinal, desencadeiam uma resposta imune mais duradoura, rápida e eficiente (SOUZA et al., 2013). Alguns estudos demonstram o poder adjuvante de lectinas (REYNA-MARGARITA et al., 2019). As lectinas são capazes de se ligar a glicoconjugados presentes na membrana celular e desencadear uma resposta imune protetora. Assim, tais proteínas são capazes de serem utilizadas em estudos de *drug delivery*, aumentando a eficácia da vacina (GUPTA et al., 2011).

Em relação à produção das lectinas, a *Escherichia coli* (*E. coli*) é uma bactéria gram-negativa que se comporta como organismo hospedeiro de amplo uso na produção de proteínas recombinantes devido à sua rápida taxa de crescimento e à capacidade de atingir altas densidades celulares em meios de culturas simples (ROSANO; CECCARELLI, 2014). No entanto, ao produzir altos níveis de proteína recombinante em *E. coli*, a bactéria pode expressar algumas dessas proteínas em corpos de inclusão, que pode ser devido a diferentes fatores como temperaturas de crescimento, concentração do indutor e tipo de promotor utilizado. A formação dos corpos de inclusão dificulta o processo de purificação efetiva, além de ser necessário um processamento mais longo envolvendo solubilização e redobrimento para a produção das proteínas bioativas. Muitas vezes, a solubilização e o redobrimento de proteínas é realizado de maneira empírica levando à baixa recuperação funcional (SINGH et al., 2015). Dessa forma, torna-se fundamental testar diferentes protocolos de expressão e solubilização das proteínas recombinantes, visando a recuperação dessas com elevado rendimento.

O seguinte trabalho tem, portanto, o objetivo de testar diferentes protocolos de solubilização, buscando minimizar corpos de inclusão e dispor mais proteínas ativas ao final do processo.

2. METODOLOGIA

Uma construção contendo os genes de interesse no vetor pET-28a(+) foi transferida por choque térmico para uma cepa de expressão *E. coli*, cepa Star. As bactérias transformadas com o plasmídeo foram cultivadas em 25 mL de meio Luria Bertani (LB) *overnight* a 37°C sob agitação. O cultivo foi então utilizado para inocular 500 mL do mesmo meio e levado até uma densidade óptica entre 0,6 e 0,8, monitorado em um espectrofotômetro a 595 nm. O cultivo foi induzido com IPTG 1 mM (Isopropil-β-D-Tiogalactopiranosídeo) e mantido por 3 h a 37°C. Após isso, o cultivo foi dividido igualmente em três porções e centrifugado a 10.000 g por 10 minutos para obter a massa celular. Os precipitados obtidos foram tratados com tampão de lise wash sem ureia de pH 8,0 e sonicados 7 vezes por 1 minuto. Após centrifugação, o sobrenadante foi recolhido e utilizado para verificação da presença da proteína na fração solúvel. A porção solúvel foi separada e purificada em sistema de cromatografia AKTA purifier.

Já o pellet adquirido da porção insolúvel foi ressuscitado em wash com ureia de pH 8,0 e deixado em câmara fria 7°C por 24 horas para melhor solubilização do sobrenadante. Após esse tempo, a porção foi novamente centrifugada e purificada em AKTA purifier. Com o resultado da purificação, as proteínas foram analisadas em SDS-PAGE 12%. Em seguida, foi realizada diálise da lectina em PBS (*phosphate buffered saline*) de pH 7,4 com 8 trocas com 1 hora de intervalo. Depois da obtenção da proteína dialisada, encaminhou para a liofilização, o qual é o processo de remoção da água na constituição de um produto através da sublimação. Com a proteína liofilizada, foi dividida em 4 partes iguais de 0,200 mg, e a partir delas, foram testados diferentes tampões de solubilização para avaliar a qualidade de cada um. Os tampões para avaliação foram wash sem ureia de pH 5,0 8M, wash sem ureia de pH 8,0, Tris-HCl 50 mM com NaCl 15 mM de pH 7,6 e Tris-HCl 25 mM de pH 8,0. As 4 frações de 0,200 mg foram ressuscitadas com 500 µL nos referentes tampões e posteriormente centrifugadas para obtenção do sobrenadante e para a avaliação da solubilização.

Também foi realizada quantificação das proteínas utilizando kit de BCA (*Pierce BCA Protein Assay Kit*) em duplicata e lido em leitor de placa com espectrofotômetro em 562 nm para melhor avaliação da qualidade da solubilização e quantidade de proteínas nos respectivos tampões.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao final do processo de purificação, as porções solúveis e insolúveis da lectina recombinante foram coletadas para análise do gel de SDS-PAGE 12%. Pode-se observar que a maior parte da proteína produzida concentrou-se nas porções insolúveis, destacando a importância de diferentes testes de solubilização de proteínas para maior aproveitamento de toda a quantidade de proteína produzida. Tais testes mostram-se essenciais para o melhor aproveitamento e recuperação de proteínas recombinantes.



Imagem 1. Gel de SDS-PAGE 12% das porções insolúveis adquiridas da lectina após purificação.

As 4 frações com os diferentes tampões após a centrifugação formaram sobrenadantes, os quais foi possível observar a qualidade da solubilização dos diferentes tampões. Os tubos 3 e 4 obtiveram melhor resultado quando observado somente os sobrenadantes adquiridos, pois resultaram em menor quantidade.

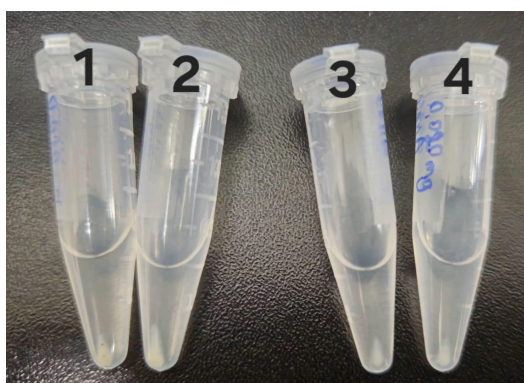


Imagem 2. Sobrenadantes obtidos após a centrifugação. 1, wash sem ureia de pH 5,0 8M; 2, wash sem ureia de pH 5,0 8M; 3, Tris-HCl 50 mM com NaCl 15 mM de pH 7,6 e 4 Tris-HCl 25 mM de pH 8,0

A quantificação por kit de BCA resultou em diferentes quantidades de proteínas nos diferentes tampões.

Tabela 1. Resultado da quantificação das proteínas nos referentes tampões.

| Tampão utilizado | Absorbância em 562 nm | Quantidade por ng/ μ L |
|---------------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| Wash sem ureia 8M pH 5,0 | 0,133 | 29,16 ng/ μ L |
| Wash sem ureia 8M pH 8,0 | 0,213 | 66,29 ng/ μ L |
| Tris-HCl 50 mM com NaCl 15 mM, pH 7,6 | 0,219 | 70,79 ng/ μ L |

Tris-HCl 25 mM, pH 8,0

0,297

130,89 ng/μL

É possível observar que o tampão Tris-HCl 25 mM, pH 8,0 obteve o melhor resultado quando analisada a quantidade de proteína. O tampão Tris-HCl 50 mM com NaCl 15 mM, pH 7,6 resultou na segunda melhor solubilização e wash sem ureia de pH 8,0 8M e wash sem ureia de pH 5,0 8M os próximos melhores resultados, respectivamente.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, é possível afirmar que todos os tratamentos para a solubilização da proteína contribuem para a obtenção solúvel da proteína, mas o tratamento com Tris-HCl 50 mM com NaCl 15 mM apresenta um resultado melhor. Outros testes precisam ser realizados para determinar as melhores condições de produção da proteína testada, para que assim o processo geral possa ser melhorado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ROSANO, Germán L; CECCARELLI, Eduardo A. **Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges**. *Frontiers in Microbiology* v. 5, 17 abr. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4029002/>>.

SINGH, Anupam et al. **Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process**. *Microbial Cell Factories* v. 14, n. 1, 24 mar. 2015. Disponível em: <<https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-015-0222-8>>.

WILDE S, et al. (2019) **Salmonella-Vectored vaccine delivering three *Clostridium perfringens* antigens protects poultry against necrotic enteritis**. *PLoS ONE* 14(2): e0197721. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197721>.

YUAN, B. et al. **Immunization with Pooled Antigens for *Clostridium perfringens* Conferred Partial Protection against Experimental Necrotic Enteritis in Broiler Chickens**. *Vaccines*, v. 10, n. 6, p. 979–979, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/vaccines10060979>.

REYNA-MARGARITA et al. **Plant Phenolics and Lectins as Vaccine Adjuvants**. *Current Pharmaceutical Biotechnology* v. 20, n. 15, p. 1236–1243, 2023. Disponível em: <<https://www.eurekaselect.com/article/99653>>.

SOUZA, MA et al. **The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties**. *Glycoconjugate Journal* v. 30, n. 7, p. 641–657, 9 jan. 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10719-012-9464-4>.

GUPTA, P N. et al. **Investigation of lectinized liposomes as M-cell targeted carrier-adjuvant for mucosal immunization**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* v. 82, n. 1, p. 118–125, 1 jan. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927776510004856?via%3Dihub>>.