

## EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE ANTÍGENOS DE *Clostridium perfringens* EM *Komagataella phaffii* COMO PROTÓTIPO VACINAL PARA ENTERITE NECRÓTICA AVIÁRIA

BEATRIZ CAMPOS DA MOTTA SANTOS<sup>1</sup>; ANDRIELE BONEMANN MADRUGA<sup>2</sup>, NATASHA RODRIGUES DE OLIVEIRA<sup>3</sup>, MARA ANDRADE COLARES MAIA<sup>4</sup>, FABRÍCIO ROCHEDO CONCEIÇÃO<sup>5</sup>, THAÍS LARRÉ OLIVEIRA BOHN<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [beatriz.cdmsantos@gmail.com](mailto:beatriz.cdmsantos@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [andrielebonemann@outlook.com](mailto:andrielebonemann@outlook.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [oliveira\\_natasha@hotmail.com](mailto:oliveira_natasha@hotmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [maraacmaia@gmail.com](mailto:maraacmaia@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [fabricio.rochedo@ufpel.edu.br](mailto:fabricio.rochedo@ufpel.edu.br)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – [thais.larreoliveira@gmail.com](mailto:thais.larreoliveira@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A enterite necrótica aviária (ENA), causada pelo bacilo *Clostridium perfringens*, é uma doença entérica de relevância no setor da avicultura, acarretando em perdas anuais estimadas em 6 bilhões de dólares para a indústria global (WADE; KEYBURN, 2015). No contexto da ENA, as cepas portadoras de fatores de virulência e patogenicidade atuam sobre os enterócitos, causando a necrose do epitélio intestinal característica da enfermidade (WALLER et al., 2024). Esta condição pode se apresentar na forma clínica (aguda), com sintomas de comportamento depressivo, penas eriçadas, ocorrência de diarreia e até mortalidade súbita; ou na forma subclínica (crônica), caracterizada pela diminuição das taxas de crescimento e conversão alimentar do animal, sendo esta a forma mais comum (EMAMI; DALLOUL, 2021; WALLER et al., 2024).

O uso de antimicrobianos como aditivos na alimentação animal propiciou a disseminação de cepas bacterianas multirresistentes, resultando na proibição desses antibióticos (BRASIL, 2022). A partir disso, surge a necessidade de buscar soluções alternativas para o controle eficaz da ENA (FATHIMA et al., 2022).

Nesse contexto, o uso de leveduras como vetores vacinais surge como uma plataforma promissora por possuírem propriedades probióticas e imunomoduladoras. Através de componentes da sua parede celular, modulam a microbiota intestinal e a resposta imune do hospedeiro, atuando tanto como veículo quanto adjuvante para o antígeno vacinal (KULKARNI et al., 2022). A levedura *Komagataella phaffii* é uma plataforma de expressão heteróloga já estabelecida e interessante para a produção de tais抗ígenos. Demonstrando ser um microrganismo com a capacidade de realizar modificações pós-tradicionais essenciais, atingir altas densidades celulares e baixo custo de cultivo (LV; CAI, 2025).

Com base nas informações apresentadas, este trabalho tem como objetivo utilizar a plataforma de expressão heteróloga da levedura *K. phaffii* como carreadora de dois antígenos (1 e 2) de *Clostridium perfringens*, visando o futuro desenvolvimento de um potencial candidato vacinal contra a enterite necrótica aviária.

### 2. METODOLOGIA

**2.1 Propagação em *Escherichia coli*:** O vetor pPICZA contendo a sequência dos antígenos 1 e 2 foi previamente construído e enviado para síntese química.

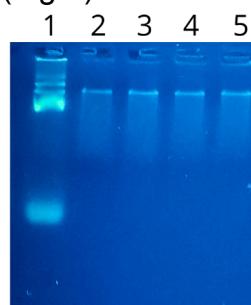
Posteriormente, os plasmídeos foram transformados em células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10 via eletroporação. Após a transformação, as células foram cultivadas em caldo Luria-Bertani (LB) com baixo teor de sal e suplementadas com 25 µg/mL de zeocina para a seleção das células transformadas.

**2.2 Linearização do plasmídeo:** Em seguida, o plasmídeo extraído foi linearizado com enzima, em reações realizadas a 37 °C, seguidas de inativação enzimática. Após a linearização, foi realizada a concentração do plasmídeo utilizando colunas de concentração, seguida de quantificação em espectrofotômetro NanoDrop.

**2.3 Expressão heteróloga em *K. phaffii*:** Após linearizado, o vetor foi novamente concentrado, quantificado e utilizado para transformação por eletroporação de células eletrocompetentes da levedura. As células foram plaqueadas em meio seletivo sólido Yeast Extract Peptone Dextrose Sorbitol (YPDS), com concentrações de 100 µg/mL e 200 µg/mL de zeocina, e incubadas a 30 °C para o crescimento das colônias transformadas. Uma colônia recombinante foi escolhida e inicialmente cultivada em meio Buffered Glycerol Complex Yeast (BMGY) até atingir a densidade óptica (600 nm) entre 2-6. Em sequência, as células foram então centrifugadas e suspensas em meio de expressão Buffered Metanol Complex Yeast (BMMY) com aumento de 10x do volume de cultura inicial. A indução da expressão foi realizada com a adição de 1% de metanol a cada 24 h, durante 96 h, visando determinar o tempo ideal de expressão para os dois抗ígenos. Amostras do cultivo foram coletadas e armazenadas para a detecção das proteínas por SDS-PAGE e Western blot, utilizando anticorpo Anti-Histidina conjugado à peroxidase (1:5000). A quantificação da expressão foi realizada através do software ImageJ, utilizando uma proteína de referência conhecida como padrão de quantificação em bandas (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

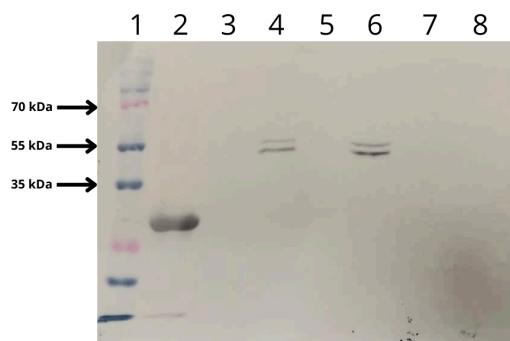
A linearização do plasmídeo foi evidenciada pela presença de uma banda única com menor migração no gel, se diferenciando do vetor circular que se apresenta em mais de uma banda (Fig.1).



**Figura 1. Gel de agarose 1% das linearizações do plasmídeo recombinante.** 1- pPICZA/1\_2 circular; 2 a 5- pPICZA/1\_2 lineares

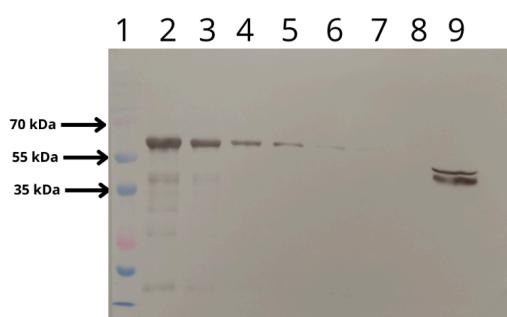
A transformação em *K. phaffii* foi eficiente e a caracterização da expressão por *Western Blot* indicou que a produção dos抗ígenos 1 e 2 foi obtida de forma satisfatória e com tamanhos esperados de 51 e 48 kDa, respectivamente, nas

amostras coletadas em 24 h e 72 h pós indução. Nos demais tempos de coleta, 48 h e 96 h, não foi detectada a expressão de nenhum dos抗ígenos (Fig. 2).



**Figura 2. Confirmação da expressão dos抗ígenos 1 e 2 através de Western Blot.** 1 – Marcador (Page ruler™ Prestained Protein Ladder- Thermo Scientific); 2 – Proteína recombinante previamente purificada (controle positivo); 3- *K. phaffii* X33-pPICZA/1\_2 0h de indução; 4- *K. phaffii* X33-pPICZA/1\_2 24h de indução; 5- *K. phaffii* X33-pPICZA/1\_2 48h de indução; 6- *K. phaffii* X33-pPICZA/1\_2 72h de indução; 7- *K. phaffii* X33-pPICZA/1\_2 96h de indução; 8- controle negativo (extrato de *K. phaffii* não transformada).

Por fim, outro *Western Blot* foi realizado, desta vez para a quantificação da expressão através do software ImageJ. Os valores foram gerados utilizando uma proteína de referência conhecida como padrão de quantificação em bandas. Ao final, o produto da expressão contendo os抗ígenos 1 e 2 foi quantificado em 9 mg/mL (Fig. 3).



**Figura 3. Western Blot para quantificação dos抗ígenos.** 1- Marcador (Page ruler™ Prestained Protein Ladder- Thermo Scientific); 2-7: Concentrações padrão de 1, 0.5 0.25, 0.125, 0.625 e 1315 mg/mL, 8- controle negativo, 9- Expressão dos抗ígenos 1 e 2.

A partir dos resultados apresentados, a expressão dos抗ígenos foi confirmada pela utilização de um anticorpo de detecção específica, demonstrando que o sistema metanol-induzível presente no vetor foi eficaz. A presença da proteína nos tempos de 24 h e 72 h, sugere uma cinética de expressão e secreção complexa. Essa variação pode ser influenciada por fatores como a estabilidade da proteína no meio de cultura ou a ocorrência de proteólise em tempos de indução prolongados, um desafio conhecido para este sistema de expressão (AHMAD et al., 2014).

#### 4. CONCLUSÕES

Conclui-se que a plataforma de expressão de *Komagataella phaffii* demonstrou ser eficaz para a produção de抗ígenos de *Clostridium perfringens*. Este trabalho estabeleceu com sucesso a obtenção de um produto em

quantidades promissoras para futuras aplicações. Trazendo assim a validação desta plataforma para a geração de biomoléculas com potencial vacinal contra a enterite necrótica aviária, abrindo caminho para as próximas etapas de avaliação da resposta imune na espécie alvo, frangos de corte. Dessa forma, os resultados aqui apresentados constituem um avanço no desenvolvimento de uma alternativa segura e eficaz no controle desta problemática.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, Mudassar *et al.* Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5301–5317, jun. 2014.
- BRASIL. Atualização sobre Uso Racional de Antimicrobianos e Boas Práticas de Produção. Silvia Lentz, 2022. Disponível em: <[https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/publicacoes/Apostila\\_AtualizaosobreUsoRacionaldeAntimicrobianoseBoasPrticasdeProduo.pdf](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/publicacoes/Apostila_AtualizaosobreUsoRacionaldeAntimicrobianoseBoasPrticasdeProduo.pdf)>. Acesso em: 27 ago. 2025
- EMAMI, Nima K.; DALLOUL, Rami A. Centennial Review: Recent developments in host-pathogen interactions during necrotic enteritis in poultry. **Poultry Science**, v. 100, n. 9, p. 101330, set. 2021.
- FATHIMA, Shahna *et al.* Necrotic Enteritis in Broiler Chickens: A Review on the Pathogen, Pathogenesis, and Prevention. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, p. 1958, 30 set. 2022.
- KULKARNI, Raveendra R. *et al.* Probiotics as Alternatives to Antibiotics for the Prevention and Control of Necrotic Enteritis in Chickens. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 6, p. 692, 16 jun. 2022.
- LV, Wen; CAI, Menghao. Advancing Recombinant Protein Expression in *Komagataella phaffii*: Opportunities and Challenges. **FEMS Yeast Research**, p. foaf010, 12 mar. 2025.
- SCHNEIDER, Caroline A.; RASBAND, Wayne S.; ELICEIRI, Kevin W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, jul. 2012.
- WALLER, Stefanie Bressan *et al.* *Clostridium perfringens* antigens and challenges for development of vaccines against necrotic enteritis in poultry. **Anaerobe**, v. 89, p. 102902, out. 2024.
- WADE, B.; KEYBURN, A. The true cost of necrotic enteritis. **Poultry World**, 9 out. 2015. Acesso em: 27 ago. 2025