

EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS COM POTENCIAL IMUNOGÊNICO CONTRA TÉTANO EM ANIMAIS

PEDRO HENRIQUE DALA NORA QUATRIN¹; CLÓVIS MOREIRA JUNIOR²;
CLEIDERSON DE LIMA AGUIRRES³; CLEIDEANNY CANCELA GALVÃO⁴;
FABRÍCIO ROCHEDO CONCEIÇÃO⁵; ÂNGELA NUNES MOREIRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – quatrinp@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – cmoreira.biotec@ufpel.edu.br

³Universidade Federal de Pelotas – cleidersonlag@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – annymedvet@gmail.com

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

⁶Universidade Federal de Pelotas – angelanmoreira@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Clostridium* corresponde a um vasto grupo de bacilos anaeróbios, Gram-positivos, formadores de endósporos que estão distribuídos de forma ubíqua por diferentes ambientes como solo, água e no trato gastrointestinal de animais e seres humanos. Essas bactérias produzem potentes exotoxinas que são responsáveis por infecções de rápida evolução e alta letalidade, conhecidas como clostridioses (HATHEWAY, 1990).

Dentre as espécies patogênicas do gênero, *Clostridium tetani* é o agente responsável pela doença do tétano que acomete os animais domésticos, principalmente bovinos, equinos e ovinos, causando prejuízos econômicos consideráveis para agropecuária mundial (UZAL et al., 2016; LOBATO et al., 2013). A infecção acontece por meio da contaminação de feridas abertas pelo *C. tetani*, que sob as condições ideais, sintetiza a neurotoxina tetânica (TeNT), que está diretamente envolvida na patogenia da doença. Os sinais clínicos incluem rigidez generalizada, espasticidade, hipertonia dos músculos que resulta em membros hiperestendidos e insuficiência cardiorespiratória (POPOFF, 2020; HATHEWAY, 1990).

Estruturalmente, a TeNT possui duas cadeias: uma cadeia leve (LC, 50 kDa) e uma cadeia pesada (HC, 100 kDa). A LC possui um domínio catalítico N-terminal, já a HC é dividida em dois fragmentos: um domínio de translocação interno e um domínio C-terminal de reconhecimento de gangliosídeos nos neurônios motores (GHOTLOO, 2021).

O rápido curso da doença associado às características do patógeno dificulta o tratamento dos animais acometidos, tornando a vacinação a principal estratégia de controle e profilaxia. Atualmente, no contexto de imunização contra o tétano, são utilizados toxóides comerciais produzidos a partir da inativação da toxina tetânica com formaldeído. Entretanto, a produção dessa vacina apresenta algumas desvantagens por ser um processo laborioso, que exige rigorosas normas de biossegurança, além da possibilidade de inativação incompleta das toxinas (ZARAGOZA et al., 2019), oferecendo riscos de toxicidade residual para os animais.

Com o intuito de otimizar esses processos e reduzir os riscos, as vacinas recombinantes expressas em *Escherichia coli* emergem como uma alternativa viável e de baixo custo para obtenção de antígenos vacinais. Sabe-se que o domínio C-terminal da HC possui epítomos responsáveis por induzir uma resposta imune (YU et al., 2018; YU et al., 2011). Partindo desse princípio, o objetivo do

estudo foi expressar em *E. coli* e caracterizar os antígenos tetânicos (TeNT1 e TeNT2) com potencial imunogênico para produção de vacinas.

2. METODOLOGIA

Transformação e expressão das proteínas recombinantes

Escherichia coli BL21 (DE3) Star foi transformada mediante choque térmico para inserção do vetor plasmidial contendo o gene de interesse, conforme descrito por Green and Sambrook (2012). Brevemente, as células transformadas de *E. coli* foram cultivadas em 10 mL de meio Luria-Bertani (LB) suplementado com 100mM canamicina e incubadas em agitador orbital (16h, 37 °C, 180 RPM)

Após, 5 mL do cultivo foi transferido para 50 mL de LB com 100mM canamicina e incubado nas mesmas condições até atingir a densidade óptica (DO_{600nm}) de 0,8 – 1,0 para indução da expressão da proteína recombinante pela adição de 0,5 mM isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) por 3 h (37 °C, 180 RPM).

Processamento dos cultivos e avaliação da solubilidade

Após a expressão da proteína recombinante, o cultivo foi centrifugado (7.000 RPM, 5 min) e o *pellet* suspenso em 10 mL de tampão de lavagem contendo 100mM lisozima e incubado por 1h a 37°C. Após essa etapa lise enzimática, os cultivos foram submetidos ao processo de sonicação em banho de gelo (60 KHz, 6 ciclos de 15 segundos) e centrifugadas (10.000 RPM, 10 min, 4 °C) para separação das frações celulares solúveis (sobrenadante do lisado celular) e insolúvel (*pellet*).

O *pellet* celular, contendo os corpos de inclusão, foi suspenso em 10 mL de tampão de lavagem contendo 8M Uréia para desnaturação e solubilização da proteína e incubado sob agitação (16h, 4 °C). Ao final dessa etapa, a amostra foi centrifugada (10.000 RPM, 20 min, 4 °C) e o sobrenadante coletado para avaliação por SDS-PAGE e *Western blot*.

Amostras de cultivo não induzido e induzido 3 h com IPTG, bem como do sobrenadante do lisado celular (solúvel) e dos corpos de inclusão (insolúvel) foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%, conforme observado na Figura 1.

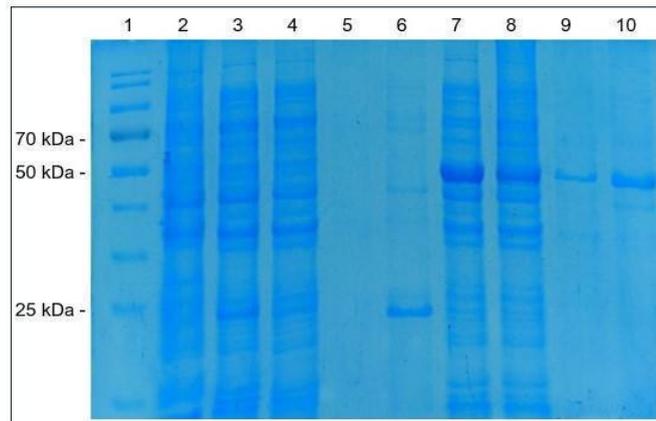
Para avaliação por *western blot*, foram aplicadas as mesmas amostras avaliadas por SDS-PAGE em outro gel e transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando o TransBlot Turbo Transfer System (Bio-Rad, EUA) a 25 V por 20 minutos. A membrana contendo as proteínas foi incubada em tampão de bloqueio (PBS-T + 5% de leite em pó desnatado) durante 1 h. Após a etapa de bloqueio, a membrana foi lavada com PBS-T e incubada com anticorpo anti-6xhis conjugado a HRP (ThermoFisher, EUA) diluído 1:10.000 em PBS-T e mantido sob agitação por 1 h, seguido de uma etapa de lavagem com PBS-T e revelação da reação por DAB (Tris HCl 50 mM pH 7,6; solução de níquel 0,03%; H₂O₂ e 3,3'-diaminobenzidina).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Expressão e caracterização das proteínas recombinantes

No gel de SDS-PAGE 12% corado com *comassie blue* foi possível visualizar a expressão dos antígenos TeNT1 e TeNT2 que apresentaram uma banda com massa molecular esperada de 25 kDa e 50 kDa, respectivamente,

quando comparadas ao marcador de massa molecular (Figura 1). A expressão



das proteínas foi confirmada por *Western Blot* mediante a visualização de uma banda imunorreativa com anticorpo anti-6xhis, uma vez que os antígenos apresentam uma Tag de 6 histidinas para facilitar a caracterização e purificação da proteína recombinante (Figura 2).

Figura 1: SDS-PAGE da expressão dos antígenos recombinantes TeNT1 (T1) e TeNT2 (T2) em gel SDS-poliacrilamida 12% 1: Marcador massa molecular; 2: Extrato de *E. coli*; 3: Extrato *E. coli* não induzido T1; 4: Extrato *E. coli* T1 induzido 3h; 5: Sobrenadante do lisado celular T1; 6: Sobrenadante do lisado 8M Uréia T1; 7: Extrato *E. coli* não induzido T2; 8: Extrato *E. coli* T2 induzido 3h; 9: Sobrenadante do lisado celular T2; 10: Sobrenadante do lisado 8M Uréia T2.

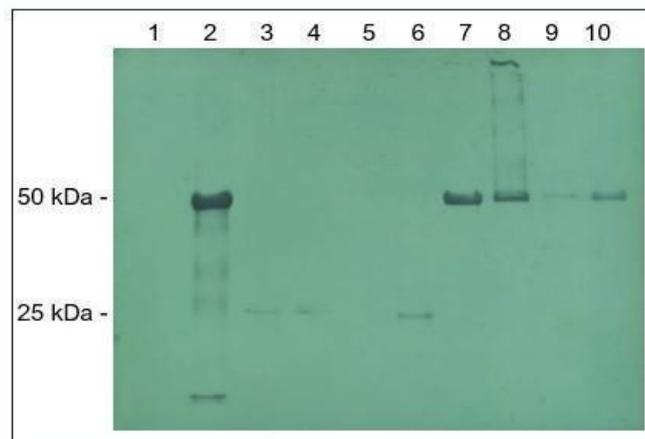


Figura 2: Western blot da expressão dos antígenos recombinantes TeNT1 (T1) e TeNT2 (T2) em gel SDS-poliacrilamida 12% 1: Marcador massa molecular; 2: Extrato de *E. coli*; 3: Extrato *E. coli* não induzido T1; 4: Extrato *E. coli* T1 induzido 3h; 5: Sobrenadante do lisado celular T1; 6: Sobrenadante do lisado 8M Uréia T1; 7: Extrato *E. coli* não induzido T2; 8: Extrato *E. coli* T2 induzido 3h; 9: Sobrenadante do lisado celular T2; 10: Sobrenadante do lisado 8M Uréia T2.

No presente estudo, foi possível expressar as proteínas recombinantes rTeNT1 e rTeNT2 eficientemente. Ambas proteínas foram expressas de forma parcialmente solúvel, sendo que a proteína rTeNT2 apresentou um nível de expressão superior quando comparado a rTeNT1 em *E. coli* Star. A otimização

dos parâmetros de expressão das proteínas rTeNT1 e rTeNT2 em *E. coli* será realizada visando melhorar a solubilidade e rendimento da expressão das proteínas. Estudos adicionais serão delineados para análise da imunogenicidade e nível de proteção induzido pelos antígenos recombinantes, conforme preconizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

4. CONCLUSÕES

O desenvolvimento de proteínas recombinantes visando a produção de antígenos eficientes, inovadores e seguros para prevenção e controle do tétano são de suma importância para a indústria veterinária e para minimizar as perdas de animais acometidos pela doença que afeta a pecuária mundial. No entanto, embora os antígenos tetânicos recombinantes expressos em *E. coli* sejam eficientemente produzidos e caracterizáveis, ainda se faz necessário a avaliação da imunogenicidade destas moléculas em experimentos com modelos animais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LIU, F. et al. Evaluation of a recombinant tetanus toxin subunit vaccine. **Toxicon**, v. 187, p. 75-81, 2020.
- YOUSEFI, M. et al. Production and characterization of recombinant light chain and carboxyterminal heavy chain fragments of tetanus toxin. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 5, n. 4, p. 220, 2013.
- HATHEWAY, C. L. Toxigenic clostridia. **Clinical microbiology reviews**, v. 3, n. 1, p. 66-98, 1990.
- POPOFF, M. R. Tetanus in animals. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 32, n. 2, p. 184-191, 2020.
- GHOTLOO, S. et al. Neutralization of tetanus toxin by a novel chimeric monoclonal antibody. **Toxicon**, v. 201, p. 27-36, 2021.
- UZAL, F. A. et al. (Ed.). **Clostridial diseases of animals**. John Wiley & Sons, 2016.
- LOBATO, F. C. F. et al. Clostridioses dos animais de produção. **Veterinária e zootecnia**, v. 20, p. 29-48, 2013.
- ZARAGOZA, N. E. et al. Vaccine production to protect animals against pathogenic clostridia. **Toxins**, v. 11, n. 9, p. 525, 2019.
- YU, R. et al. The immunogenicity of the C fragment of tetanus neurotoxin in production of tetanus antitoxin. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.
- YU, R. et al. Enhanced expression of soluble recombinant tetanus neurotoxin Hc in *Escherichia coli* as a tetanus vaccine candidate. **Immunobiology**, v. 216, n. 4, p. 485-490, 2011.
- GREEN, M. R.; SAMBROOK, Joseph. Molecular cloning. **A Laboratory Manual 4th**, 2012.