

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Produção e caracterização de quimeras recombinantes C e D
de *Clostridium botulinum*

Luciana Aquini Fernandes Gil

Pelotas, 2012

LUCIANA AQUINI FERNANDES GIL

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE QUIMERAS RECOMBINANTES C E D de
*Clostridium botulinum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Veterinária Preventiva).

Orientador: Fabricio Rochedo Conceição

Co-Orientador: João Rodrigo Gil de los Santos

Pelotas, 2012

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

G463p Gil, Luciana Aquini Fernandes

Produção e caracterização de quimeras recombinantes C e D para *Clostridium botulinum* /Luciana Aquini Fernandes Gil ; orientador Fabrício Rochedo Conceição; co-orientador João Rodrigo Gil de los Santos. Pelotas,2012.-74f.;; il.-
Dissertação (Mestrado) Área de conhecimento em Veterinária Preventiva.–Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Faculdade de Veterinária . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2012.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Geferson Fischer (Faculdade de Veterinária, UFPel)

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (CDTec/Biotecnologia, UFPel)

Dr. Felipe Masiero Salvarani (Escola de Veterinária, UFMG)

Prof. Dr. Fabricio Rochedo Conceição (CDTec/Biotecnologia, UFPel)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus dois amores, Felipe Fernandes Gil e Ana Carolina Fernandes Gil, meus filhos, minhas razões de viver, em troca de todos os momentos que deixei de dedicar a eles.

E agradeço por todos os momentos de felicidade com que preenchem os meus dias só pelo fato de estarem aqui.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais queridos, Pedro e Ariete, pela dedicação, por todo o investimento e apoio para que eu chegasse até aqui, e pelos ótimos exemplos que foram e são para mim, de caráter e honestidade; que desde sempre mostraram quão importante na vida é o crescimento pelo estudo, empenho, e conhecimento, sempre priorizando a minha formação acadêmica e me incentivando a evoluir como indivíduo a partir do caminho da educação.

Ao meu marido e companheiro, Diego Gil de los Santos, pelo incentivo, carinho, compreensão, apoio, senso crítico, tempo e disposição.

Ao meu sogro e professor preferido, Carlos Gil Turnes, que foi o responsável por esta jornada, pela disponibilidade, apoio, e valiosos conselhos e ensinamentos, e sempre acreditou possível esta realização.

À minha sogra, Anabel, sempre com uma palavra incentivadora para seguir em frente, e na torcida pelo sucesso.

Aos colegas do laboratório de Imunologia Aplicada do Centro de Biotecnologia, em especial ao Carlos Eduardo e ao Gustavo, pela importante colaboração na execução dos experimentos.

Ao Fabrício, orientador, pelo apoio e incentivo.

Ao pessoal do LANAGRO – MG, pela colaboração nas análises finais do experimento.

À Universidade Federal de Pelotas que me proporcionou a realização do curso de Pós-Graduação em Veterinária.

MUITO OBRIGADA!

Resumo

FERNANDES GIL, Luciana Aquini. **Produção e caracterização de quimeras recombinantes C e D de *Clostridium botulinum***. 2012. 74f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas

O botulismo bovino é uma intoxicação letal causada pela ingestão da neurotoxina produzida pelo *Clostridium botulinum* principalmente dos tipos C e D que atua inibindo a liberação de acetilcolina na junção neuromuscular levando à morte por paralisia flácida, com grande importância econômica e sanitária, sendo uma das principais causas de morte em bovinos adultos no Brasil. O controle imunológico do botulismo bovino depende da presença de anticorpos neutralizantes contra as neurotoxinas botulínicas (NBOTs) no momento da ingestão da toxina pré-formada, por meio de imunização dos animais. Atualmente, a imunização é realizada com toxóides obtidos da detoxificação do extrato de cultivos de cepas selecionadas de *C. botulinum* dos tipos C e D que apresentam limitações quanto à eficiência e produção. Uma alternativa ao uso dos toxóides clássicos é a produção de vacinas recombinantes usando antígenos específicos de alta pureza e imunogenicidade. A fração C-terminal da cadeia pesada da neurotoxina botulínica tem sido o alvo principal no desenvolvimento de alternativas recombinantes a serem utilizadas como vacinas. Neste trabalho, duas quimeras recombinantes bivalentes compostas pelos domínios de ligação ao receptor neuronal (DLRNs) foram produzidas em *Escherichia coli*, caracterizadas e avaliadas em camundongos. As quimeras recombinantes rLTB-C-D e rC-D foram produzidas a partir da clonagem e expressão de um gene sintético que codifica a porção C-terminal das NBOTs construído com os códons preferenciais de *E. coli* e a subunidade B da enterotoxina termolábil de *E. coli* (LTB), um potente adjuvante da resposta imune humoral. O nível de expressão dos antígenos foi de aproximadamente 100mg de cada antígeno recombinante por litro de cultura. Um ELISA realizado para avaliar a antigenicidade das moléculas mostrou que ambas foram reconhecidas pelos soros padrões, sugerindo conservação de epitopos semelhantes aos dos DLRNs nativos. Ambas as quimeras foram inócuas para os camundongos, os quais não apresentaram lesões no local da inoculação bem como alteração de comportamento. Nos soros dos camundongos inoculados com as quimeras recombinantes foi possível detectar níveis de anticorpos neutralizantes. O grupo inoculado com a rLTB-C-D apresentou nível de anticorpos neutralizantes semelhante ao do grupo rC-D + hidróxido de alumínio confirmando o potencial adjuvante da LTB. As quantidades de antígenos utilizados foram equimolares. Esses resultados demonstram que as quimeras recombinantes foram imunogênicas. Os soros dos camundongos inoculados com as diferentes vacinas também foram analisados por ELISA indireto utilizando rC e rD como antígenos. Os dados obtidos neste ELISA corroboram os dados da soroneutralização.

Palavras-chave: Botulismo bovino. Neurotoxinas botulínicas C e D. Vacinas recombinantes. LTB.

Abstract

GIL Fernandes, Luciana Aquini. **Production and characterization of recombinant chimeras C and D of *Clostridium botulinum***. 2012. 74f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas

Bovine Botulism is a lethal intoxication caused by the ingestion of the neurotoxins produced by *Clostridium botulinum* types C and D that inhibit the release of acetylcholine at the neuromuscular junction leading to death by flaccid paralysis. It produces important economic losses, being a major cause of casualties in cattle in several regions of Brazil. The control of the disease depends on the presence of neutralizing antibodies against botulinum neurotoxins (BONTs) in immunized cattle. Immunization is obtained inoculating toxoids produced from cultures of selected strains of *C. botulinum* types C and D, whose industrial production has limitations concerning efficiency and productivity. An alternative to the use of these toxoids is the production of recombinant antigens with high levels of purity and antigenicity. The C-terminal fraction of the heavy chain of botulinum neurotoxins has been the main target in the development of recombinant vaccines with promising results. In this work, two recombinant bivalent chimeras for the control of bovine botulism consisting of the neuronal receptor binding domains (NRBDs) of botulinum C and D toxins were efficiently produced in *Escherichia coli*. They were characterized and evaluated in mice, with promising results. Both the recombinant chimeras rLTB-C-D and rC-D were produced by cloning and expressing a synthetic gene encoding the C-terminal portion of both BONTs. The former also included the preferred codons of the *E. coli* heat labile enterotoxin B subunit (LTB), a potent humoral immune adjuvant. The levels of expression of the recombinant antigens were satisfactory, yielding approximately 100 mg of each recombinant antigen per liter of culture. An ELISA performed to assess the antigenicity of the molecules showed that both were recognized by sera of immunized mice suggesting the preservation of epitopes with the properties of native BONTs. Both chimeras induced high levels of neutralizing antibodies without undesirable effects. The level of neutralizing antibodies of the groups inoculated with equimolar concentrations of rLTB-C-D and rC-D containing Aluminum Hydroxide as adjuvant were similar, confirming the adjuvant properties of LTB. These results demonstrated that the recombinant chimeras were immunogenic. Sera from mice inoculated with commercial vaccines were also analyzed by ELISA using as antigens rC and rD, corroborating the neutralization.

Keywords: Bovine botulism. Botulinum neurotoxins C and D. Recombinant vaccines. LTB.

Lista de Figuras

Artigo 1

Figura 1	Esquema da patogenia do Botulismo	36
----------	---	----

Artigo 2

Figura 1	Sequência do gene sintético contendo as regiões codificadoras para expressão dos domínios DLRN ^C e DLRN ^D das NBOTs C e D...	59
----------	--	----

Figura 2	Eletroforese em gel de agarose 1% dos vetores usados neste trabalho.....	61
----------	--	----

Figura 3	SDS-PAGE 12% da expressão dos antígenos recombinantes produzidos em <i>E. coli</i>	62
----------	--	----

Figura 4	SDS-PAGE 10% dos antígenos recombinantes purificados mediante cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose ...	63
----------	--	----

Figura 5	<i>Western blot</i> com soro de coelho anti CT e MAb anti-6xHis da rLTB-C-D, rC-D, rC e rD	64
----------	--	----

Figura 6	Absorbâncias em ELISA das proteínas recombinantes rLTB-C-D e rC-D, determinadas com antitoxinas botulínicas C e D, utilizando como controle negativo extrato de <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	65
----------	---	----

Figura 7	Absorbâncias por ELISA do <i>pool</i> de soros na diluição 1/1600 de camundongos vacinados com rLTB-C-D, rLTB-C-D com hidróxido de alumínio, rC-D com hidróxido de alumínio, vacina comercial e grupo controle, contra as proteínas recombinantes rC e rD.....	66
----------	--	----

Lista de Tabelas

Artigo 1

Tabela 1	Classificação de <i>Clostridium botulinum</i> de acordo com as neurotoxinas produzidas e espécies suscetíveis	35
----------	---	----

Artigo 2

Tabela 1	Vetores, insertos, enzimas de restrição e produtos obtidos na clonagem das proteínas recombinantes rC-D, rLTB-C-D, rC e rD	60
Tabela 2	Nível de anticorpos neutralizantes em unidades internacionais por mililitro (UI/mL) de antitoxina botulínica C e antitoxina botulínica D em <i>pool</i> de soros de camundongos imunizados, por meio da técnica de soroneutralização em camundongos	67

Lista de Abreviaturas

Al(OH) ₃	hidróxido de alumínio
ADP	Adenosina difosfato
BCA	ácido bicinconínico
BSA	soro albumina bovina
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention - USA</i>
CL	cadeia leve
CP	cadeia pesada
CT	toxina colérica
DAB	diaminobenzidina
DC	domínio catalítico
DLRN	domínio de ligação ao receptor neuronal
DO	densidade óptica
DT	domínio de translocação
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
h	hora
IPTG	isopropil-3-D-tiogalactopiranosídeo
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais
LB	Luria Bertani
LTB	subunidade B da enterotoxina termolábil de <i>E. coli</i>
M	molar
MAb	Anticorpo monoclonal
mg	miligrama
mL	mililitro

mM	mili molar
NBOT	neurotoxina botulínica
ng	nanograma
nm	nanômetro
PBS	tampão fosfato-salino
PBS – T	tampão fosfato-salino + Tween
rpm	rotações por minuto
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio
SNARE	<i>soluble NSF attachment receptor</i>
UFPeL	Universidade Federal de Pelotas
UI/mL	unidades internacionais por mililitro
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

Sumário

1	Introdução	15
2	Artigos	17
2.1	Artigo 1: Botulismo bovino	17
2.2	Artigo 2: Produção e caracterização de quimeras recombinantes C e D de <i>Clostridium botulinum</i>	37
3	Conclusão	68
4	Referências	69

1. Introdução

Atualmente o rebanho bovino mundial passa de 1 bilhão de animais, segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). A Índia lidera o ranking com 282 milhões de cabeças, seguida do Brasil, o maior produtor comercial, com pouco menos de 200 milhões de cabeças de gado (USDA, 2011). A bovinocultura brasileira tem superado ano a ano seus índices técnicos, atingindo taxas de desfrute em ascensão contínua. Porém, alguns problemas sanitários se contrapõem a esta tendência, proporcionando um crescimento aquém do esperado. Dentre eles, destaca-se o botulismo, uma doença fatal caracterizada pela paralisia muscular causada por neurotoxinas produzidas pela bactéria *Clostridium botulinum* (NBOTs).

C. botulinum é um bacilo anaeróbio, Gram-positivo, formador de esporos, encontrado no solo, água, matéria orgânica de origem animal e vegetal, e no trato gastrointestinal dos animais. Os esporos são extremamente resistentes, podendo resistir por longos períodos nos mais diversos ambientes, germinando e proliferando em carcaças ou material vegetal em decomposição, nos quais produzem uma neurotoxina que, quando ingerida, causa a doença (LOBATO et al., 2008).

Os surtos de botulismo bovino geram grandes perdas econômicas principalmente em função do número de animais mortos todos os anos (LISBOA et al., 1996; DUTRA et al., 2001; DUTRA et al., 2005; LOBATO et al., 2008; HOLZHAUER et al., 2009). A enfermidade foi diagnosticada pela primeira vez no Brasil, no Piauí (TOKARNIA et al., 1970), e posteriormente em diversos estados brasileiros como Goiás (LANGENEGGER et al., 1987), Rio Grande do Sul (GIL TURNES et al., 1984; MÉNDEZ et al., 1987), São Paulo (LISBOA et al., 1996) e Mato grosso do Sul (BONILHA et al., 1996).

Existem sete tipos de *C. botulinum* denominados A, B, C, D, E, F e G, classificados de acordo com as toxinas que produzem. O botulismo bovino é

provocado pela ingestão das NBOTs C ou D (HATHEWAY, 1990). Estruturalmente, as NBOTs apresentam uma cadeia leve (CL) e outra pesada (CP), que formam três domínios característicos (MONTECUCCO & SCHIAVO, 1994). O domínio catalítico (DC), constituído pela CL, está ligado por uma ponte dissulfeto ao domínio de translocação (DT), que constitui a porção N-terminal da CP. A porção C-terminal da CP, atóxica, constitui o domínio de ligação ao receptor neuronal (DLRN), onde estão localizados os epitopos protetores das NBOTs (CLAYTON, 1995; RAVICHANDRAN, 2007).

Medidas profiláticas gerais de manejo, como suplementação mineral e retirada das carcaças, e específicas como vacinação devem ser adotadas. Os toxóides botulínicos comerciais atualmente utilizados apresentam limitações no que diz respeito a sua produção industrial: 1- *C. botulinum* produz baixos níveis de NBOT *in vitro*; 2- a produção em larga escala é laboriosa, onerosa e pouco previsível e; 3- biossegurança durante o processo de detoxificação (BYRNE E SMITH, 2000; LEE et al., 2007). Conseqüentemente existe uma demanda para o desenvolvimento de vacinas recombinantes que poderiam aliviar os problemas associados à produção industrial de toxóides botulínicos. Através desta tecnologia, espera-se aumentar a produção de antígenos seguros (DLRNs são atóxicos) e tornar a produção menos laboriosa e onerosa.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar uma vacina recombinante bivalente a ser utilizada no controle do botulismo bovino, composta pelos DLRNs das NBOTs C e D fusionados. Para tal, foi utilizado o sistema de expressão de proteínas heterólogas baseado na bactéria *Escherichia coli*, cuja viabilidade já foi comprovada (BALDWIN et al., 2008). Tendo em vista que a proteção contra o botulismo é totalmente dependente da presença de anticorpos anti-NBOT neutralizantes no soro do animal no momento da ingestão da neurotoxina pré-formada (STEINMAN et al., 2007), a capacidade adjuvante da subunidade B da enterotoxina termolábil de *E. coli* (LTB), um potente adjuvante da resposta imune humoral (CONCEIÇÃO et al., 2006; Da HORA et al., 2011), também foi avaliada neste projeto. Neste projeto, as quimeras recombinantes rC-D e rLTB-C-D foram eficientemente produzidas em *E. coli*, mostrando-se antigênicas, imunogênicas e capazes de gerar anticorpos neutralizantes em camundongos.

2. Artigos

2.1 Artigo 1

Botulismo bovino

Formatado conforme as normas da revista Ciência Rural

Botulismo bovino

Bovine botulism

Fernandes Gil, L. A.¹; Cunha, C.E.P.²; Moreira, G. M.²; Gil de los Santos, J. R.¹; Gil-Turnes, C.²; Conceição, F. R.²

¹Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

²Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

RESUMO

O botulismo em bovinos resulta da ingestão de toxina produzida pelo *Clostridium botulinum* principalmente dos tipos C ou D, previamente formada em carcaças animais, água estagnada ou rações e suplementos alimentares contaminados. Surtos de botulismo bovino representam grandes perdas econômicas e problemas sanitários como a contaminação das pastagens. A prevenção e controle do botulismo bovino são realizados com suplementação mineral e vacinação dos animais. Atualmente, os toxóides utilizados na imunização dos animais apresentam limitações quanto a sua produção e eficácia, existindo uma demanda para o desenvolvimento de vacinas recombinantes que poderiam aliviar tais limitações. Por meio desta tecnologia, espera-se aumentar a produção de antígenos seguros, atóxicos e tornar a produção menos laboriosa e onerosa. Esta revisão tem por objetivo salientar a importância da prevenção da doença, com ênfase especial na vacinação e nas vacinas de última geração.

1

2 PALAVRAS-CHAVE: botulismo bovino, *Clostridium botulinum*, toxina botulínica,
3 vacinas recombinantes.

4 ABSTRACT

5 Bovine Botulism results from the ingestion of the toxins produced by
6 *Clostridium botulinum* types C or D in animal carcasses that contaminate water, feeds
7 or supplements. Outbreaks of the disease produce high mortality and economic losses in
8 vast regions of the country. Prevention and control of the disease are based on mineral
9 supplementation and vaccination of susceptible animals. Currently, the production of
10 the toxoids has limitations in relation to productivity and efficiency, demanding the
11 development of recombinant vaccines that could overcome these limitations. This
12 technology may increase the productivity and safety of antigen production with
13 decreasing costs. This review aims to highlight the importance of disease prevention,
14 with special emphasis on immunization and last generation vaccines development.

15

16 KEY WORDS: Bovine botulism, *Clostridium botulinum*, botulinum toxins,
17 recombinant vaccines.

18

19

20

21

2 INTRODUÇÃO

3 As atividades relacionadas à bovinocultura ocupam lugar de destaque na matriz
4 produtiva do agronegócio brasileiro, assumindo importância econômica e social. Em
5 termos econômicos, a bovinocultura não contribui apenas através de sua dinâmica
6 econômica interna, mas também da geração de divisas via mercado externo. O rebanho
7 bovino no Brasil chegou em 2010 a 209,5 milhões de cabeças, com um aumento de
8 2,1% em relação ao ano de 2009, ocupando o quarto lugar no mundo (IBGE, 2011).

9 Doenças de diferente etiologia afetam a produtividade da bovinocultura
10 brasileira. O botulismo bovino, também conhecido como “doença da vaca caída”,
11 constitui um entrave para o desenvolvimento desta atividade em lugares e sistemas de
12 produção definidos. No Mato Grosso do Sul, o segundo estado da federação com o
13 maior rebanho bovino do país (IBGE, 2010), estimou-se que na década de 90 o
14 botulismo matou 195.000 bovinos de uma população de 23 milhões de cabeças (RIET-
15 CORREA & GEVEHR, 2007), já no Rio Grande do Sul, onde a doença foi conhecida
16 como “Mal de Alegrete” morreram anualmente, entre os anos de 1978 e 2001, 1170
17 bovinos de uma população estimada em 13 milhões de cabeças (GIL TURNES et al.,
18 1984). A doença aparece também nas regiões sudeste, nordeste e norte, sendo uma das
19 três principais causas de mortalidade em bovinos, resultando em perdas econômicas
20 significativas na bovinocultura nos diferentes sistemas de produção (TOKARNIA, 1970
21 apud RIET-CORREA & GEVEHR, 2007; DUTRA et al., 2001;).

22

23

2 No Brasil, a enfermidade foi relatada pela primeira vez em 1970 no Estado do
3 Piauí (TOKARNIA et al., 1970) e desde então foram registrados surtos em outras
4 regiões do país, com a estimativa de centenas de milhares de mortes atribuídas às
5 toxinas botulínicas C e D, problema agravado pela intensa contaminação ambiental por
6 esporos de *Clostridium botulinum* (DUTRA et al., 2001). Outro fator de grande
7 importância no aparecimento e intensidade dos surtos de botulismo bovino é a baixa
8 disponibilidade de fósforo nos solos associada a falta de suplementação mineral, que
9 levam à ingestão de carcaças, hábito conhecido como osteofagia. A doença acarreta
10 perdas tanto na bovinocultura de corte quanto na de leite, sendo os animais com maior
11 exigência nutricional, como as vacas em gestação ou lactantes, e os animais com mais
12 de dois anos, os primeiros a serem afetados (DUTRA et al., 2001).

13 Esta revisão tem por objetivo descrever o botulismo bovino, com ênfase especial
14 na vacinação e nas vacinas de última geração.

15 A DOENÇA

16 Botulismo é o termo coletivo utilizado para identificar os efeitos
17 neurofisiológicos causados pela ingestão de potentes neurotoxinas produzidas pelas
18 bactérias *Clostridium botulinum*, *C. barati*, *C. butyricum* e *C. argentinense* em
19 diferentes espécies animais e no homem (WEBB et al., 2007; SMITH, 2009). A
20 enfermidade foi descrita em todos os continentes, embora afetando espécies diferentes
21 em função dos hábitos alimentares das populações animais e humanas (WHITLOCK,
22 2004).

2 Os micro-organismos do gênero *Clostridium* são anaeróbios estritos,
3 esporogênicos, Gram positivos, encontrados no solo, esgotos, sedimentos marinhos,
4 trato intestinal de humanos e animais (HATHEWAY, 1990). Foram descritas cerca de
5 100 espécies distribuídas em áreas geográficas distintas, a maioria na microbiota
6 intestinal, sendo varias delas patogênicas para os animais e humanos.

7 *C. botulinum* é classificado função das neurotoxinas produzidas por cada um
8 deles (Tabela 1), possuindo marcada especificidade de espécie.

9 São sete os tipos de neurotoxinas botulínicas, identificadas como A, B, C₁, D, E,
10 F e G, que diferem quanto à antigenicidade, resistência térmica e letalidade para
11 diferentes espécies animais (BIBERSTEIN & HIRSH, 2003). Os diferentes tipos podem
12 ser diferenciados sorologicamente, embora sua ação farmacológica no sistema nervoso
13 seja idêntica (STERNE & BATTY, 1975).

14 A toxina botulínica do subtipo C₂ é única em estrutura e ação farmacológica.
15 Considerada como toxina botulínica binária (SIMPSON, 1986), age não como
16 neurotoxina, mas ribosilando o ADP, o que afeta o transporte dos líquidos através das
17 membranas, provocando alterações entéricas e cardiopulmonares, sendo seu papel no
18 botulismo animal ainda mal definido (BIBERSTEIN & HIRSH, 2003).

19 São consideradas as mais potentes toxinas naturais, sendo classificadas como
20 Agente com potencial bioterrorista Categoria A pelo CDC (*Centers for Disease Control*
21 *and Prevention*, Bethesda, USA), com uma dose de 1 ng/kg de peso corporal é
22 suficiente para causar morte por paralisia dos músculos respiratórios (DePAZ et al.,
23 2005; SOBEL, 2005; DUX et al., 2011; PRIGENT et al., 2010).

2 As toxinas botulínicas são sintetizadas pela forma vegetativa da bactéria em
3 ambientes com nutrientes, anaerobiose e pH adequados, e liberadas pela lise bacteriana
4 como polipeptídeo de 150 kDa com características de protoxina (WHITLOCK, 2004).
5 Enquanto os esporos são medianamente resistentes ao calor, as toxinas botulínicas são
6 termosensíveis, inativadas a 80°C por 10 minutos (FDA Bad Bug Book).

7 As toxinas C₁ e D produzem o botulismo em bovinos, ovinos, equinos e,
8 esporadicamente, em outras espécies como aves aquáticas e martas.

9 Em bovinos criados a campo a intoxicação pode ocorrer devido ao hábito da
10 osteofagia observada em animais mantidos em áreas deficientes em fósforo sem
11 adequada suplementação mineral, e nos bovinos confinados pela ingestão de alimentos
12 contaminados com as toxinas botulínicas C ou D como silagens, rações, camas de
13 frango, e/ou água de dessedentação contaminadas com carcaças de animais (DUTRA et
14 al., 2001). Böhnelt et al. (2008) alertaram para o risco de toxinfecção por produção de
15 toxina botulínica a partir de bactérias alojadas nas amígdalas de animais que houvessem
16 ingerido alimento contaminado, e mesmo o risco de contaminação de produtos animais
17 como a carne, oriunda de animais portadores de *C. botulinum* nas amígdalas.

18 As toxinas são absorvidas e transportadas aos neurônios sensíveis por via
19 hematogênica (KIYATKIN & SIMPSON, 1997). As neurotoxinas botulínicas causam
20 paralisia flácida por ligação a receptores específicos nas terminações nervosas
21 colinérgicas periféricas, bloqueando a liberação da acetilcolina, o que impede a
22 progressão do estímulo nervoso (WHITLOCK, 2004). A Figura 1 mostra os eventos
23 envolvidos na patogenia.

2 As manifestações clínicas podem aparecer de um a 17 dias após a ingestão do
3 alimento ou água contaminada. Podem se apresentar nas formas hiperaguda, aguda,
4 subaguda ou crônica, variando de menos de 24 h a 30 dias. A maioria dos casos se dá na
5 forma aguda, com evolução para óbito em um a dois dias (RIET-CORREA &
6 GEVEHR, 2007). Casos com duração maior do que sete dias são considerados crônicos,
7 provavelmente devido à ingestão de doses subletais de toxina, embora exista a
8 possibilidade de morte (ROBERTS, 1959).

9 Os sinais clínicos da intoxicação, comum aos sete tipos de botulismo, incluem
10 incoordenação muscular, afetando principalmente os membros posteriores e evoluindo
11 para os anteriores, cabeça e pescoço, o que resulta em decúbito externo abdominal,
12 protrusão da língua e distúrbios na apreensão de alimentos, mastigação e deglutição. A
13 paralisia flácida pode ser detectada pela flacidez da língua, da mandíbula e da cauda.
14 Não há alteração da consciência, nem de temperatura. Ocorre bradicardia e a respiração
15 é dispneica, diafragmática, com inspiração em duas fases, sendo a segunda prolongada.
16 Quando a paralisia afeta músculos respiratórios, ocorre morte por insuficiência
17 respiratória. Alterações sensoriais ocorrem somente no caso de perda de sensibilidade
18 decorrente de lesão muscular isquêmica, quando o curso da doença se estende por mais
19 de um dia. Nos sobreviventes a recuperação é lenta, podendo persistir sinais residuais
20 por meses (BIBERSTEIN & HIRSH, 2003). Quanto mais alta a dose de toxina na
21 junção neuromuscular, mais rapidamente evolui o quadro clínico da intoxicação e pior o
22 prognóstico quanto à sobrevivência (WHITLOCK, 2004).

23 O diagnóstico baseia-se em dados epidemiológicos tais como presença de
24 cadáveres na pastagem, osteofagia, ausência de vacinação, nos sinais clínicos, e pela

2 demonstraco da toxina botulínica em amostras de contido ruminal, fragmentos de
3 fígado, contido intestinal, ossos e alimento/água suspeitos (STERNE & BATTY,
4 1975).

5 Para o controle do botulismo bovino, uma das medidas a tomar  a
6 suplementaco nutricional e mineral do rebanho, principalmente com fósforo. A
7 eliminaco das carcaças do campo também auxilia o controle, uma vez que elimina a
8 fonte de contaminao do solo e da gua. No caso de bovinos confinados, o
9 armazenamento correto do feno, rao ou silagem, assim como a remoo de todas as
10 carcaças de pequenos roedores e a não utilizao da cama de frango como fonte de
11 alimentao, são medidas profiláticas efetivas que podem e devem ser adotadas por
12 criadores em todo o país, junto com a vacinao dos rebanhos (LOBATO et al, 1998;
13 DUTRA et al., 2001).

14 ESTRUTURA E MECANISMO DE AO DAS NEUROTOXINAS BOTULÍNICAS

15 As neurotoxinas botulínicas são macromoléculas constituídas de uma
16 subunidade neurotóxica e uma ou mais subunidades não tóxicas (HATHEWAY, 1990).
17 A molécula  sintetizada como um polipeptídeo relativamente inativo, protoxina, com
18 uma cadeia única de 150 kDa, sendo liberada no meio quando ocorre a lise bacteriana.
19 Por ao de proteases teciduais ou bacterianas a molécula  clivada gerando a
20 neurotoxina ativa com duas cadeias denominadas cadeia pesada com 100 kDa e cadeia
21 leve com 50 kDa, ligadas por uma ponte dissulfeto (SIMPSON, 1986; MONTECUCCO
22 & SCHIAVO, 1994; SMITH, 2009). A cadeia leve  o domínio catalítico da
23 neurotoxina enquanto a porão C-terminal da cadeia pesada reconhece o receptor

1

2 neuronal, propiciando a internalização da toxina em vesículas endocíticas. A porção N-
3 terminal da cadeia pesada media a translocação do domínio catalítico das vesículas para
4 o citoplasma do neurônio, onde se dá a ação neurotóxica (LEE et al., 2007). O modelo
5 para explicar o mecanismo de ação das neurotoxinas botulínicas, similar ao da toxina
6 diftérica e algumas lectinas de plantas, está diretamente ligado à estrutura da holotoxina
7 (SIMPSON, 1986).

8 A paralisia por intoxicação com a neurotoxina botulínica se dá em quatro etapas:
9 reconhecimento e ligação da molécula da toxina ao receptor da terminação nervosa,
10 internalização da cadeia leve na célula nervosa e ação do fragmento internalizado
11 impedindo a liberação da acetilcolina dos terminais sinápticos neuronais no músculo,
12 impedindo a contração muscular (HATHEWAY, 1990).

13 O domínio catalítico (zinco endopeptidase) ou cadeia leve da neurotoxina tem
14 como alvo uma das três proteínas SNARE (*Soluble NSF Attachment Receptor*) que
15 constituem o centro do processo que permite a fusão das vesículas sinápticas contendo
16 neurotransmissores com a membrana plasmática neuronal, o que resultaria na liberação
17 do neurotransmissor na fenda sináptica. A clivagem de uma destas proteínas impede a
18 fusão da vesícula na membrana e a conseqüente liberação do neurotransmissor
19 acetilcolina da célula nervosa, o que resulta na cessação do impulso nervoso ao longo
20 do axônio (SMITH, L., 2009).

21

22

23

2 VACINAS

3 Medidas profiláticas e terapêuticas contra o botulismo vêm sendo aplicadas
4 desde 1940, visando inibir a ação da toxina botulínica. Um toxóide pentavalente contra
5 as neurotoxinas A a E foi utilizado nos Estados Unidos de 1979 a 2011 na imunização
6 de cientistas e pessoas que manipulavam toxinas botulínicas e soldados sujeitos a
7 ataques bioterroristas. Embora sendo uma vacina experimental e de uso controlado,
8 devido a reações sistêmicas relacionadas ao esquema de vacinação e resultados pouco
9 satisfatórios em relação à proteção imunológica às toxinas dos tipos C, D e E
10 principalmente, o CDC resolveu deixar de fornecer a vacina aos trabalhadores de
11 laboratórios e pesquisadores que manipulam toxina botulínica (BYRNE & SMITH ,
12 2000; BALDWIN et al., 2008; CDC, 2011).

13 Os toxóides têm sido utilizados como uma estratégia efetiva na proteção dos
14 rebanhos contra o botulismo, embora o cultivo, isolamento, purificação e detoxificação,
15 passos inerentes à sua produção, apresentem dificuldades em escala industrial, como
16 baixo rendimento na produção de toxina pelo micro-organismo *in vitro*, risco de
17 intoxicação pela manipulação de grandes quantidades de toxina, utilização de extrato
18 bacteriano contendo proteínas de clostrídios que pode influenciar a imunogenicidade e
19 reatividade da vacina, bem como a presença de formaldeído residual utilizado na
20 detoxificação (BYRNE & SMITH, 2000; SMITH, 2009). Assim sendo, no sentido de
21 reduzir custos e aumentar a biossegurança na obtenção e aplicação do produto,
22 pesquisadores buscam uma vacina recombinante a partir de um dos três domínios da
23 holotoxina, principalmente o domínio C-terminal da cadeia pesada, ou domínio de

1

2 ligação ao receptor, que foi o único em vários estudos que se mostrou capaz de proteger
3 camundongos (BYRNE & SMITH, 2000; YARI et al, 2010).

4 Os estudos sobre a toxina tetânica deram a diretriz para o desenvolvimento de
5 vacinas recombinantes para as neurotoxinas botulínicas (SMITH, 2009).

6 Tecnologias de engenharia genética foram utilizadas na tentativa de otimizar a
7 expressão gênica e aumentar a estabilidade da proteína recombinante. Vacinas
8 recombinantes para neurotoxinas botulínicas dos tipos A, B, C1, E e F já foram
9 produzidas e se mostraram eficientes, seguras e estáveis em testes em modelos animais
10 (SMITH., 2004).

11 Vários sistemas para apresentação dos antígenos das toxinas botulínicas têm sido
12 relatados como *Pichia pastoris* (BYRNE & SMITH, 2000; DUX et al., 2010) e *E. coli* (
13 CLAYTON et al., 1995), com testes em diferentes modelos experimentais. Três grupos
14 de pesquisa avaliaram o potencial de vacinas de DNA contendo genes sintéticos
15 codificantes do fragmento C-terminal das neurotoxinas botulínicas A e F, demonstrando
16 que vacinas baseadas em DNA protegem parcialmente os animais de desafio com a
17 neurotoxina botulínica A (CLAYTON & MIDDLEBROOK, 2000; SHYU et al., 2000;
18 BENNETT et al., 2003). Vetor viral foi utilizado por Lee et al. (2001) que
19 introduziram o gene que codifica o domínio de ligação ao receptor neuronal da NBOT
20 A no vírus da encefalite equina, e produziram a proteína em células BHK. O desafio
21 dos camundongos pós vacinação mostrou correlação entre a proteção conferida aos
22 animais e os títulos de anticorpos determinados por ELISA dos soros, alcançando altos
23 níveis de anticorpos e proteção a doses maiores de toxina no desafio com intervalo de

2 28 dias entre as imunizações. Zichel et al. (2010) avaliaram vacinas monovalentes e
3 multivalentes compostas pelos DLRNs A, B e E obtidas em sistemas de expressão livre
4 de células e alcançaram resultados semelhantes aos obtidos em sistemas de expressão
5 em células.

6 Os sistemas de expressão em *Escherichia coli* ou *Pichia pastoris* são os mais
7 utilizados para produção de vacinas recombinantes pelo baixo custo e biossegurança
8 que oferecem, apesar de apresentarem desvantagens como a formação de corpos de
9 inclusão comumente observada na expressão em *E. coli*, pirogênios da parede celular da
10 bactéria e hiper-glicosilação das proteínas expressas em *P. pastoris*, o que pode ser
11 evitado por expressão intracelular com a inserção do gene em vetores para este fim
12 (SMITH, 2009).

13 Por causa de códons específicos e composição rica em timina e adenina do DNA
14 clostridial, torna-se necessária à construção de genes sintéticos com códons
15 preferenciais para uma otimização da expressão em sistemas heterólogos (BYRNE &
16 SMITH, 2000).

17 A variabilidade antigênica dos mosaicos de neurotoxinas C e D, produzidos por
18 algumas cepas de *C. botulinum*, é um desafio no desenvolvimento de vacinas
19 recombinantes para estes sorotipos, uma vez que a sequência de aminoácidos varia de
20 um mosaico para o outro em relação à similaridade com a neurotoxina C ou D, variando
21 consequentemente a resposta imune (WEBB et al., 2007).

22 Kiyatkin et al. (1997) construíram uma holotoxina recombinante (rBoNT/C)
23 eliminando a atividade da endoprotease zinco dependente, com depleção da atividade

2 tóxica embora mantendo a capacidade de ligação e internalização pela mutação de três
3 aminoácidos essenciais na ligação do zinco, e com potencial antigênico e imunogênico
4 contra a toxina nativa quando administrada tanto por via oral quanto subcutânea.

5 CONCLUSÃO

6 O botulismo bovino é uma das principais causas de mortalidade na
7 bovinocultura, ocasionando significativo prejuízo econômico. Vacinas recombinantes,
8 produzidas em escala laboratorial, mostraram-se promissoras. Desta forma, testes de
9 potência utilizando toxinas botulínicas recombinantes produzidas em escala industrial,
10 devem ser conduzidos visando à consolidação desta tecnologia.

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

REFERÊNCIAS

- ARNON S.S et al. Botulinum Toxin as a Biological Weapon: Medical and Public Health Management [Electronic version]. **The Journal of American Medical Society**, v. 285, p. 1059-1070, 2001.
- ATASSI M.Z., OSHIMA M. Structure, activity, and immune (T and B cell) recognition of botulinum neurotoxins, **Critical Reviews in Immunology**, v. 19 p. 219–260, 1999.
- BALDWIN, M.R. et al. Subunit vaccine against the seven serotypes of botulism. **Infection and Immunity**, v.76, p.1314-1318, 2008.
- BENNETT, M. et al. DNA vaccination protects against botulinum neurotoxin type F. **Vaccine**, v.21, p.3110-3117, 2003.
- BIBERSTEIN, E.L.; HIRSH, D.C. Os clostrídios. In: HIRSH, D. C. & ZEE, Y. C. **Microbiologia veterinária**, Guanabara Koogan, 2003. p.226-228.
- BÖHNEL, H. et al. Tonsils – Place of botulinum toxin production: Results fo routine laboratory diagnosis in farm animals. **Veterinary Microbiology**, v.130, p.403-409, 2008.
- BRASIL. Instrução Normativa n.15, de 17 de julho de 2001. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Diário Oficial n. 138, Seção 1, de 18.7.2001.
- BYRNE, M.P.; SMITH, L.A. Development of vaccines for prevention of botulism. **Biochimie**, v.82, p.955-966, 2000.
- CDC. Notice of CDC’s Discontinuation of Investigational Pentavalent (ABCDE) Botulinum Toxoid Vaccine for Workers at Risk Occupational Exposure to Botulinum Toxin. **MMRW**, 2011; v.60(42), p.1452.

- 1
2 CLAYTON, J.; MIDDLEBROOK, J.L. Vaccination of mice with DNA encoding a
3 large fragment of botulinum neurotoxin serotype A. **Vaccine**, v.18, p.1855-1862, 2000.
- 4 DePAZ, R.A. et al. Formulation of botulinum neurotoxina heavy chain fragments for
5 vaccine development: mechanisms of adsorption to an aluminum – containing adjuvant.
6 **Vaccine**, v.23, p.4029-4035, 2005.
- 7 DUTRA, I.S. et al. Surtos de botulismo em bovinos no Brasil associados à ingestão de
8 água contaminada. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, p.43-48, 2001.
- 9 DUX, M.P. et al. Purification of a recombinant heavy chain fragment C vaccine
10 candidate against botulinum serotype C neurotoxin [rBoNT (Hc)] expressed in *Pichia*
11 *pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v.75, p.177-185, 2011.
- 12 FOYNES, S. et al. Vaccination against type F botulinum toxin using attenuated
13 *Salmonella enterica* var Typhimurium strains expressing the BoNT/F H(C) fragment.
14 **Vaccine**, v. 21, p. 1052-1059, 2003.
- 15 Gil TURNES, C. et al. Mal de Alegrete: Evidências de *Clostridium botulinum* D como
16 agente etiológico. In: ANAIS XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA
17 VETERINARIA, 1984.
- 18 HATHEWAY, C.L. Toxigenic clostridia. **Clinical Microbiology Reviews**, v.3, p.66-
19 98, 1990.
- 20 KIYATKIN, N. et al. Induction of an immune response by oral administration of
21 recombinant botulinum toxin. **Infection and Immunity**, v.65, p.4586-4591, 1997.
- 22 LEE, J. C. et al. C terminal half fragment (50kDa) of heavy chain components of
23 *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxins can be used as an effective vaccine.
24 **Microbiology and Immunology**, v.51, p.445-455, 2007.
- 25

1

2 LOBATO, F.C.F. et al. Potência de toxóides botulínicos bivalentes C e D produzidos e
3 comercializados no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.20, p.35-
4 38, 1998.

5 MONTECUCCO, C.; SCHIAVO, G., Mechanism of action of tetanus and botulism
6 neurotoxins. **Molecular Microbiology**, v.13, p.1-8, 1994.

7 RIET – CORREA, F.; GEVEHR, C. F. Botulismo. In: RIET – CORREA et al. **Doenças**
8 **de Ruminantes e Equídeos**, Pallotti, 2007. 3ª edição, vol.1, p.215-224.

9 ROBERTS, R.S. Clostridial diseases. In: STABLEFORTH, A.W., GALLOWAY, I.A.
10 **Infectious diseases of animals – Diseases due to bacteria**, Butterworths Scientific
11 Publications, 1959. vol.1, p.209-228.

12 SIMPSON, L.L. Molecular pharmacology of botulinum toxin and tetanus toxin. **Annual**
13 **Review of Pharmacology and Toxicology**, v.26, p.427-453, 1986.

14 SHYU, R.H. et al. DNA vaccination using the fragment C of botulinum neurotoxin type
15 A provided protective immunity in mice. **Journal of Biomedical Science**, v.7, p.51–57,
16 2000.

17 SMITH, L.A. Botulism and vaccines for its prevention. **Vaccine**, v.27, p.33-39, 2009.

18 STERNE, M.; BATTY, I. Pathogenic Clostridia. Butterworths, Londres, 1975.

19 SOBEL, J. Botulism. **Clinical Infectious Disease**, v.41, p.1167-1173, 2005.

20 TOKARNIA, C.H. et al. Botulismo em bovinos no Piauí, Brasil. **Pesquisa**
21 **Agropecuária Brasileira**, v.5, p.465-472, 1970.

22 WEBB, R.P. et al. Protection with recombinant *Clostridium botulinum* C1 and D
23 binding domain subunit (Hc) vaccines against C and D neurotoxins. **Vaccine**, v.25,
24 p.4273-4782, 2007.

25

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

WHITLOCK, R.H. Neurotoxigenic clostridia. In: GYLES, C.L. et al. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**, Blackwell Publishing, 2004. 3rd Edition, cap.11, p.117-124.

YARI, K. et al. Optimization of the BoNT/ A – Hc expression in recombinant *Escherichia coli* using the Taguchi statistical method. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.56, p.35-42, 2010.

ZICHEL, R. et al. Efficacy of a Potential Trivalent Vaccine Based on Hc Fragments of Botulinum Toxins A, B, and E Produced in a Cell-Free Expression System. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.17, p.784-792, 2010.

2 Tabela 1. Classificação de *Clostridium botulinum* de acordo com as neurotoxinas
 3 produzidas e espécies suscetíveis.

		TOXINAS							SUSCETÍVEIS
	A	B	C ₁	C ₂	D	E	F	G	
4	TIPO								
5	A	+++							H, A
6	B		+++						H, A, E
7	C _α		+++	+	+				B, A
8	C _β			+++					B
9	D		+		+++				B
10	E					+++			H
11	F						+++		H
	G							+++	

12 H: humanos; A: aves; E: equinos; B: bovinos (Adaptada de Sterne e Batty, 1975)

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

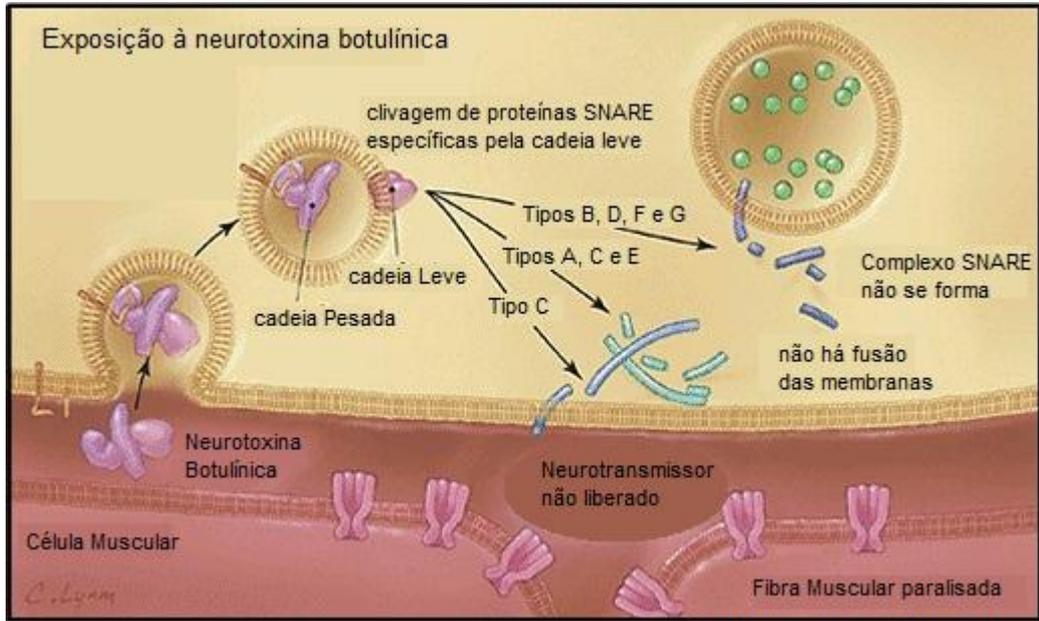


Figura 1. Esquema da patogenia do Botulismo

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

2.2 Artigo 2

Produção e caracterização de quimeras recombinantes C e D de
Clostridium botulinum

Formatado conforme as normas da revista Ciência Rural

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

Produção e caracterização de quimeras recombinantes C e D de *Clostridium botulinum*

Production and characterization of recombinant chimeras C and D of *Clostridium*

botulinum

Fernandes Gil, L.A.¹; Cunha, C.E.P.²; Moreira, G.M.²; Salvarani, F.M.³; Assis, R.A.³;

Gil de los Santos, J.R.¹; Gil-Turnes, C.²; Conceição, F.R.²

¹Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

²Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade
Federal de Pelotas, Pelotas, RS

³Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

RESUMO

O botulismo bovino é uma intoxicação causada pela ingestão de neurotoxinas botulínicas dos tipos C1 e D, principalmente, que atuam na junção neuromuscular impedindo a liberação de acetilcolina resultando em paralisia flácida e consequente morte do animal. Atualmente a principal medida de controle do botulismo bovino é a imunização dos rebanhos com um toxóide produzido a partir de cultivos de *Clostridium botulinum*, um processo que apresenta diversas limitações. Uma alternativa ao uso dos toxóides clássicos é a produção de vacinas recombinantes usando antígenos específicos de alta pureza e imunogenicidade. Neste trabalho foram produzidas e caracterizadas quimeras recombinantes, alcançando um nível de expressão dos antígenos recombinantes de aproximadamente 100 mg de cada antígeno recombinante por litro de cultura. As proteínas recombinantes foram imunogênicas, estimulando a produção de anticorpos neutralizantes detectáveis por meio de soroneutralização em camundongos.

PALAVRAS-CHAVE: Botulismo, *Clostridium botulinum*, toxinas botulínicas, vacinas recombinantes.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

ABSTRACT

Bovine Botulism is an intoxication caused by the ingestion of botulinum neurotoxins types C and D, which act at the neuromuscular junction by preventing the release of acetylcholine resulting in flaccid paralysis and death of the animal. Currently the primary control measure of the disease is the immunization of cattle with toxoids produced from cultures of *Clostridium botulinum*, a process that has several limitations. An alternative to conventional toxoids is the use of pure and highly immunogenic specific recombinant antigens. In this work we report the production and characterization of recombinant chimeras for the control of bovine botulism. The expression of recombinant antigens achieved yields of approximately 100 mg of each recombinant antigen per liter of culture. The recombinant proteins were immunogenic, stimulating the production of neutralizing antibodies detected in serum neutralization test in mice.

KEYWORDS: botulism, *Clostridium botulinum*, botulinum toxins, recombinant vaccines.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

INTRODUÇÃO

O botulismo bovino é, desde seu primeiro diagnóstico no Brasil em 1970 (TOKARNIA et al., 1970), uma das mais importantes doenças limitantes dos sistemas de produção extensivos, acometendo, sobretudo, fêmeas em gestação ou lactação, com a estimativa de centenas de milhares de mortes (DÖBEREINER et al., 1992; DUTRA & DÖBEREINER, 1995). É considerada uma das principais causas de mortalidade de bovinos adultos no Brasil (DUTRA et al., 2001; DUTRA et al., 2005; COSTA et al., 2008, LOBATO et al., 2008) e no mundo (HOLZHAUER et al., 2009).

É causado principalmente pelas neurotoxinas C1 e D produzidas pela forma vegetativa das bactérias *Clostridium botulinum*. Embora exista uma especificidade de espécie para as neurotoxinas botulínicas, a ação farmacológica é semelhante entre elas (STERNE & BATTY, 1975; SHONE et al, 2009). As NBOTs, substâncias biológicas com maior poder letal conhecidas, atuam bloqueando a liberação de acetilcolina na junção neuromuscular o que leva ao quadro característico de paralisia flácida (SHONE et al., 2009). Uma única molécula anula a função de uma célula nervosa, sendo a dose letal estimada em primatas de 1ng/kg de peso corporal (BYRNE & SMITH, 2000; DePAZ et al., 2005). Sua molécula consiste de um cadeia polipeptídica de 150 kDa formada por uma cadeia leve (50 kDa) e outra pesada (100 kDa) ligadas entre si por pontes dissulfeto. Estruturalmente, essas subunidades são organizadas em três domínios distintos que, juntos, são essenciais para a ação neurotóxica: I- domínio de ligação ao receptor neuronal (DLRN), de 50 kDa, atóxico, imunoprotetor e localizado na região carboxiterminal da cadeia pesada, responsável pela ligação da toxina à célula nervosa; II- domínio de translocação (DT), de 50 kDa e localizado na região aminoterminal da

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

cadeia pesada, responsável pela internalização do domínio catalítico e; III- domínio catalítico (DC), de 50 kDa e localizado na cadeia leve, com atividade de zinco protease (MONTECUCCO & SCHIAVO, 1994).

A principal alternativa para o controle do botulismo bovino é a vacinação dos animais suscetíveis. Tradicionalmente o imunógeno utilizado é um toxóide obtido por inativação das toxinas produzidas por cepas selecionadas de *C. botulinum* em cultivo líquido. Essa tecnologia apresenta limitações pela difícil predição do rendimento, assim como pelos riscos para o pessoal envolvido na produção, o que acarreta em variações do custo de produção (CLAYTON & MIDDLEBROOK, 2000). A eficiência dos toxóides está relacionada com a produção e manutenção de altos títulos de anticorpos neutralizantes, o que requer longos períodos e múltiplas administrações vacinais (BENNET et al., 2003). Além destas limitações de produção, um estudo que avaliou a eficiência dos toxóides contra botulismo bovino produzidos e comercializados no Brasil na década de 80, mostrou que as vacinas testadas eram pouco antigênicas, não induzindo os níveis de anticorpos neutralizantes preconizados pela Farmacopéia Britânica ou Européia (LOBATO et al., 1998).

Uma alternativa ao uso dos toxóides clássicos é o desenvolvimento de vacinas recombinantes usando antígenos específicos de alta pureza e imunogenicidade. O objetivo deste trabalho foi produzir e avaliar quimeras recombinantes compostas pelos domínios DLRN C e DLRN D e pela subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB), um potente adjuvante da resposta imune humoral (DA HORA et al., 2011), expressas em *E. coli* BL21 (DE3) Star.

MATERIAL E MÉTODOS

Clonagem do gene sintético

O gene sintético para os DLRN^C e DLRN^D, com 2574 pb (Figura 1), foi desenhado com os códons preferenciais para expressão em *E. coli*, com sítios de restrição para as enzimas *KpnI*, *XhoI*, *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII* e um *linker* de três resíduos de glicina entre as sequências para os DLRNs C e D. A síntese do gene foi realizada pela empresa Epoch Biolabs® (USA), que enviou o gene clonado no plasmídeo pUC19.

O gene sintético foi digerido com as enzimas de restrição apropriadas, liberando os insertos para a construção da rLTB-C-D, rC-D, rC e rD (Tabela 1). Os vetores de expressão em *E. coli* pAE e pAE/*ltb* também foram digeridos com as mesmas enzimas de restrição (Tabela 1), nas condições indicadas pelo fabricante, para posterior ligação dos insertos nos vetores. Ambas as construções foram purificadas entre uma digestão e outra mediante o *kit* de purificação e concentração de DNA illustra™ GFX™ PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, UK).

Após as reações com as endonucleases e purificações, realizou-se eletroforese em gel de agarose 0,8% para verificação da eficácia das reações e a extração dos genes, a partir da respectiva banda no gel. O inserto foi purificado do gel de agarose a 0,6% utilizando o *kit* supracitado. Após a purificação e quantificação por outro gel de agarose, os genes foram inseridos nos vetores pAE e pAE/*ltb* mediante ligação com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen, UK) a 16°C por 40 min. Para seleção dos clones recombinantes, *E. coli* TOP10F foi transformada por choque térmico (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) com o produto final de cada reação de ligação e cultivada em meio Luria-Bertani (LB) sólido com 100 µg/ml de ampicilina *overnight*. Posteriormente o

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

DNA plasmidial de cada colônia, extraído com fenolclorofórmio, foi analisado em gel de agarose a 0,8%. As colônias recombinantes foram cultivadas em 3 mL de meio LB líquido com 100 µg/ml de ampicilina, sendo posteriormente extraídos os plasmídeos com o *kit* *illustra*TM *plasmidPrep*TM Mini Spin Kit (GE Healthcare, UK). Para confirmação das colônias recombinantes utilizou-se endonucleases que geraram dois fragmentos de tamanhos conhecidos observados em gel de agarose, selecionadas com o auxílio do software comercial Vector NTI AdvanceTM11 (Invitrogen, USA).

Expressão e purificação das proteínas recombinantes

Com a confirmação de clones recombinantes de ambas as construções, plasmídeos contendo o inserto de cada uma das quimeras foram inseridos em *E. coli* BL21 (DE3) Star por choque térmico (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) a fim de expressar as proteínas correspondentes.

O produto da transformação foi cultivado em meio LB líquido com 100 µg/mL de ampicilina em agitador orbital (200 rpm e 37°C), até atingir a $DO_{600} = 0,6-0,8$. Para indução da expressão utilizou-se IPTG 5 mM (isopropil-3-D-tiogalactopiranosídeo) e o cultivo incubado em agitador orbital a 250 rpm a 37°C por 3 h. *Pellets* de alíquotas de 1 mL foram usados para eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% para verificação da expressão. *E. coli* BL21 (DE3) Star transformada e não induzida foi usada como controle negativo da expressão. Os clones que expressaram proteínas de massa molecular esperada foram cultivados em larga escala.

As células bacterianas em meio líquido induzidas por 3 h foram centrifugadas a 10000 g por 5 min a 4°C. Para a rLTB-C-D os corpos de inclusão foram lavados três a cinco vezes com PBS e tratados com 0,4% (w/v) N-Lauroylsarcosine em PBS sob

2 agitação por 48 h a 4°C. Após este período a proteína solubilizada foi diluída 1:5 em
3 PBS adicionado de 0,2% (p/v) N-Lauroylsarcosine, e dialisada por 24 h em 1 L de PBS
4 para cada 10 mL de solução com proteína, adicionado de N-Lauroylsarcosine a 0,1%
5 (p/v), seguida de diálise gradual, lenta, em PBS adicionado de Triton X-100 a 0,05%
6 (v/v).

7 Para a obtenção de rC-D os corpos de inclusão foram lavados três a cinco vezes
8 com PBS e tratados com uréia 8 M para solubilizar a proteína, que foi posteriormente
9 diluída 1:2 em PBS e dialisada contra PBS contendo Triton X-100 a 0,05% (v/v).

10 Para a obtenção da rC os corpos de inclusão foram igualmente lavados três a
11 cinco vezes com PBS e solubilizados com uréia 8 M, seguido de diluição 1:4 em PBS e
12 dialisada diretamente em PBS contendo Triton X-100 a 0,05% (v/v).

13 A rD foi produzida parcialmente solúvel e parte insolúvel. A purificação da
14 fração solúvel foi realizada com eluição da proteína nas frações de 5 a 30% em AKTA
15 wash e 5 a 40% em AKTA wash adicionado de 0,2% de N-Lauroylsarcosine.

16 As proteínas recombinantes foram purificadas mediante cromatografia de
17 afinidade em coluna de Ni-sepharose (GE Healthcare, UK). As proteínas foram
18 quantificadas por BCATM Protein Assay (USA), conforme as instruções do fabricante,
19 utilizando BSA como padrão.

20

21 **Caracterização das quimeras recombinantes**

22 A caracterização das proteínas recombinantes foi feita por *Western blot* (WB).
23 Após eletroforese em gel SDS-PAGE as proteínas foram transferidas para membranas
24 de nitrocelulose que foram incubadas com solução bloqueadora de leite em pó a 5% em
25 PBS-T por 12 h, lavadas e incubadas com soro de coelho antitoxina colérica (CT)

1

2 (Sigma, USA) 1:4000 ou anticorpo monoclonal anti-histidina (MAb anti-6xHis) 1:4000
3 sob agitação por 1 h. Após lavagens, as membranas foram incubadas com conjugados
4 anti-coelho e anti-camundongo, respectivamente e reveladas com DAB e peróxido de
5 hidrogênio. A reação com o cromógeno foi bloqueada com lavagens com água
6 destilada.

7

8 **Antigenicidade das quimeras recombinantes**

9 Para avaliar a antigenicidade das quimeras foi realizado um ELISA utilizando
10 como anticorpo primário as antitoxinas botulínicas C e D padrões fornecidas pelo
11 Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO/MG). As placas
12 foram sensibilizadas com as proteínas recombinantes rLTB-C-D e rC-D na
13 concentração de 200 ng/cavidade diluídas em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6),
14 incubadas por 1 h a 37°C. Após a sensibilização foram bloqueadas com leite em pó em
15 PBS-T por 18 h, lavadas com PBS-T por três vezes e incubadas com as antitoxinas
16 botulínicas C e D, na concentração de 1 UI/mL por 1 h a 37°C. As preparações foram
17 lavadas com PBS-T e incubadas com conjugado anti-ovino na diluição 1:4000. Após a
18 revelação com a solução cromógena foi feita a leitura das absorbâncias em leitor de
19 ELISA em 450 nm. O teste foi realizado em triplicata para cada proteína recombinante e
20 para o controle negativo (extrato de *E. coli*).

21

22 **Imunogenicidade das quimeras recombinantes**

23 Para avaliação da imunogenicidade foram utilizados 40 camundongos Swiss de
24 cinco a seis semanas, fornecidos pelo Biotério Central da UFPel, divididos em cinco
25 grupos com oito animais em cada grupo imunizados com: 1- PBS, 2- toxóide comercial,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

3- rLTB-C-D, 4- rLTB-C-D + hidróxido de alumínio (15%), 5- rC-D + hidróxido de alumínio (15%). Os animais foram vacinados com 45,6 µg de rLTB-C-D e 40,6 µg de rC-D, em doses de 150 µL, intraperitoneal e 250 µL de toxóide comercial, pela mesma via. O esquema de vacinação foi 0, 14, 28 dias e coleta de sangue aos 35 dias, quando os animais foram sacrificados. O soro foi obtido por centrifugação das amostras e o *pool* de cada grupo foi utilizado para o ELISA e para a soroneutralização.

A produção de anticorpos contra as proteínas recombinantes no soro dos camundongos imunizados foi verificada por ELISA indireto usando rC e rD como antígeno. Placas de 96 cavidades foram sensibilizadas com 200 ng de cada proteína recombinante (rC ou rD) por cavidade, diluídas em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6). Foi realizada uma titulação dos soros dos camundongos a partir da diluição 1/100 até a diluição 1/12800 do *pool* de soros de cada grupo, e utilizou-se anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:4000).

Todos os animais foram tratados conforme as determinações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel. Registro no CEEA: 9286

Título de anticorpos neutralizantes

O *pool* de soros foi titulado pelo método de soroneutralização em camundongos, de acordo com a EUROPEAN PHARMACOPEIA (1998), no LANAGRO/MG. O título de anticorpos foi estimado por REED e MUENCH (1938) e expresso em UI/mL.

RESULTADOS

Clonagem do gene sintético

A análise do DNA de colônias de *E. coli* TOP10F transformadas com os produtos da ligação mostrou vários clones contendo plasmídeos com tamanho superior aos controles pAE/*ltb* e pAE, sugerindo uma alta eficiência de clonagem.

Na figura 2, é possível observar clones recombinantes pAE/*ltb-c-d* e pAE/*c-d* bem como o vetor pUC19 contendo o gene sintético.

Expressão e purificação das proteínas recombinantes

A expressão das proteínas recombinantes rLTB-C-D, rC-D, rC e rD (Figura 3) confirmou a clonagem das mesmas. O nível de expressão dos antígenos recombinantes foi satisfatório, gerando aproximadamente 100 mg de cada antígeno recombinante por litro de cultura. *Escherichia coli* BL21 DE3 Star transformadas com pAE-*c*, pAE-*d*, pAE-*c-d* ou pAE-*ltb-c-d* expressaram respectivamente, após a indução com IPTG, proteínas de aproximadamente 50, 50, 100 e 112 kDa, correspondentes as massas moleculares preditas pelo programa Vector NTI Advance 11 (Invitrogen, UK).

Com exceção de rD, que foi produzido na forma solúvel, os demais antígenos recombinantes formaram corpos de inclusão. O rD foi purificado sem desnaturante. Após a solubilização da rLTB-C-D em N-Lauroylsarcosine e da rC-D e rC em tampão contendo 8 M de uréia, as proteínas recombinantes foram purificadas mediante cromatografia de afinidade em coluna de Ni-sepharose (GE Healthcare, UK), sendo que o grau de pureza foi bastante satisfatório (Figura 4). Todos os antígenos recombinantes foram dialisados contra PBS, visando o *refolding* dos mesmos. Algumas bandas

1
2 menores que a quimera rLTB-C-D, provavelmente referentes à proteínas truncadas,
3 foram observadas no SDS-PAGE.

4 5 **Western Blot**

6 Após transferência das proteínas do gel SDS-PAGE 10% para membrana de
7 nitrocelulose foi realizado *WB* com anticorpos MAb anti-6xHis na diluição 1:4000 onde
8 foram visualizadas bandas compatíveis com as proteínas rLTB-C-D (112 kDa) e rC-D
9 (100 kDa) (Figura 5 painel A, colunas 2 e 3, respectivamente). No painel B (figura 5),
10 observa-se na amostra do *pellet* do cultivo induzido de *E. coli* BL21 (DE3) Star
11 transformada com rC-D (coluna 2), uma banda de aproximadamente 100 kDa e na
12 coluna 3 uma banda do mesmo peso molecular correspondente à rC-D purificada.

13 Na membrana de nitrocelulose tratada com soro anti-CT, somente a quimera
14 rLTB-C-D foi reconhecida pelo soro anti-CT. Bandas inferiores a quimera também
15 reagiram com o soro anti-CT, comprovando a presença de proteínas truncadas (Figura
16 5C).

17 18 **Antigenicidade das quimeras recombinantes**

19 Visto que as quimeras recombinantes não foram reconhecidas pelos soros
20 padrões anti-NBOT C e D no *WB*, um ELISA foi realizado para avaliar a antigenicidade
21 destas moléculas.

22 As absorvâncias das proteínas recombinantes rLTB-C-D e rC-D pela técnica de
23 ELISA, mostraram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre si e o extrato de *E. coli*
24 BL21(DE3) Star (Figura 6).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

Imunogenicidade das quimeras recombinantes

Os *pools* de soros dos grupos vacinados com as proteínas recombinantes rLTB-C-D, rLTB-C-D com hidróxido de alumínio e rC-D com hidróxido de alumínio contra a proteína recombinante rC, apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) com os grupos vacinados com o toxóide comercial e com o controle, embora sem diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre eles. Para a proteína rD, os grupos vacinados com proteína recombinante adicionada de hidróxido de alumínio não apresentaram diferença significativa entre si, porém apresentaram diferença com os grupos vacinados com toxóide comercial e PBS. O grupo vacinado com rLTB-C-D, sem adjuvante, não apresentou diferença significativa com os grupos rC-D com hidróxido e toxóide (Figura 7).

Título de anticorpos neutralizantes

Os títulos gerados pelas quimeras são mostrados na tabela 2. O título de anticorpos neutralizantes de antitoxina botulínica C e antitoxina botulínica D obtidos por meio da técnica de soroneutralização em camundongos indicam uma melhor resposta para antitoxina D na utilização da proteína recombinante rLTB-C-D associada ao hidróxido de alumínio, obtendo-se um título de 2 UI/mL, superior ao do toxóide comercial, que foi de 1 UI/mL. Na antitoxina C, a utilização das quimeras associadas ou não ao uso de adjuvante apresentou títulos de 2 UI/mL, menores do que o título obtido com o toxóide comercial (5 UI/mL).

DISCUSSÃO

1
2
3
4 Neste estudo, clonamos e expressamos quimeras recombinantes a partir de um
5 gene sintético para os domínios de ligação ao receptor neuronal das toxinas botulínicas
6 C e D, com 2574 pb, desenhado com os códons preferenciais de *E. coli* BL21 (DE3)
7 Star. A construção de quimeras é um método padrão usado para incrementar a expressão
8 de proteínas solúveis e facilitar a purificação de proteínas (ARAI et al., 2004). A
9 construção de quimeras proteicas envolve a adição de *linkers* de aminoácidos entre os
10 domínios constituintes das mesmas, e por isso um *linker* de três glicinas foi incorporado
11 entre os DLRNs recombinantes visando favorecer a conformação independente das
12 subunidades. Os resultados de vários estudos de seleção de *linkers* sugerem que a
13 flexibilidade e hidrofobicidade do *linker* são importantes fatores relacionados à
14 funcionalidade dos domínios da quimera (GEORGE & HERINGA, 2003; ARAI et al.,
15 2004). Tanto a composição quanto o tamanho do *linker* devem ser levados em conta, já
16 que o tamanho pode afetar a estabilidade da proteína, conformação da molécula e
17 orientação dos domínios (GEORGE & HERINGA, 2003). Essa seleção é
18 particularmente importante na preservação da funcionalidade dos domínios
19 independentes. Os vetores pAE e pAE/*ltb* foram utilizados a fim de permitir a fusão de
20 seis resíduos de histidina às proteínas heterólogas, possibilitando sua identificação
21 através da técnica de WB e a purificação por cromatografia de afinidade, além de
22 fusionar os DLRNs em fase com a LTB (rLTB-C-D).

23 As proteínas recombinantes expressas foram caracterizadas por WB utilizando
24 anticorpos específicos contra a cauda de histidina e toxina colérica, no caso da rLTB-C-
25 D. O soro anti CT reagiu com a porção LTB da molécula. Visto que o WB realizado

1

2 com as antitoxinas botulínicas C e D padrões produzidas em ovinos pelo
3 LANAGRO/MG não apresentou reação, provavelmente por ser esta uma técnica
4 desnaturante (dados não mostrados), foi realizado um ELISA utilizando como antígenos
5 as quimeras rLTB-C-D e rC-D, que foram reconhecidas pelos soros padrões, os quais
6 não reagiram com antígenos da *E. coli* BL21 (DE3) Star utilizada na expressão ($p <$
7 $0,05$), demonstrando que são antigênicas. Este resultado sugere que as quimeras
8 conservaram epitopos semelhantes aos dos DLRNs nativos e poderiam gerar anticorpos
9 que reconheceriam os mesmos domínios na toxina nativa, sendo assim uma molécula
10 com potencial para ser usada como vacina contra botulismo bovino.

11 No teste de imunogenicidade a resposta foi maior em relação à rD, o que já foi
12 relatado por outros pesquisadores que testaram a resposta antigênica aos toxóides
13 monovalentes e bivalentes produzidos na Austrália (LOBATO et al., 1999;
14 WOODWARD et al., 2003). Os títulos mais baixos das quimeras bivalentes com LTB
15 em relação à rC poderiam estar relacionados à posição da fração $DLRN^C$ na construção,
16 localizada entre as frações LTB e $DLRN^D$, com a possível interiorização de algum
17 epitopo de reconhecimento importante ou com a modificação da conformação molecular
18 devido a sua posição. O aumento da dose de imunização ou adição de *linkers* maiores
19 entre as frações LTB e $DLRN^C$ e entre $DLRN^C$ e $DLRN^D$ poderiam permitir um melhor
20 reconhecimento de $DLRN^C$ e aumentar a imunogenicidade (BIE et al., 2010). A
21 diferença nos títulos de anticorpos obtidos por Qi Liang (2004) demonstrou que o
22 tamanho da molécula de um gene que codifica uma quimera poli epitopo determina a
23 resposta imune a um antígeno quimérico, porém o aumento da imunogenicidade relativa
24 ao tamanho do gene só se dá dentro de um certo intervalo. Isto pode ser devido à
25 instabilidade de uma molécula grande com alta interatividade, e sugere que a

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

imunogenicidade de uma proteína pode ser afetada por alterações sutis no interior da estrutura do polipeptídio.

A adição de LTB na molécula quimérica tem por objetivo aumentar a baixa imunogenicidade que vacinas recombinantes apresentam (DA HORA et al., 2011). Os resultados observados no ELISA mostram um maior valor de absorvância, mesmo que sem diferença estatística significativa, para a quimera bivalente rLTB-C-D em comparação às demais construções, o que é corroborado pelos resultados obtidos na soroneutralização, mostrando claramente o potencial adjuvante da LTB, visto que o grupo inoculado com a rLTB-C-D apresentou nível de anticorpos neutralizantes semelhante ao do grupo rC-D + Al(OH)₃ e maior do que o toxóide comercial para antitoxina botulínica D.

A titulação dos níveis de anticorpos neutralizantes de antitoxinas botulínicas C e D pela técnica de soroneutralização realizado seguindo as determinações da EUROPEAN PHARMACOPEIA (1998), demonstrou que não houve diferença entre os títulos de anticorpos contra a toxina botulínica C nos animais inoculados com as proteínas recombinantes (1,0 UI/mL), e que a adição de hidróxido de alumínio como adjuvante não incrementou a resposta induzida pela quimera contendo a fração LTB, também de 1,0 UI/mL. Também foi verificado que a vacina convencional induziu uma resposta marcadamente superior, 5,0 UI/mL, sugerindo que a dose de antígeno recombinante utilizado deveria ser aumentada. A utilização da quimera recombinante rLTB-C-D associada ao adjuvante obteve uma melhor resposta para antitoxina botulínica D, 2,0 UI/mL, apresentando o dobro do título obtido com o toxóide comercial. Este resultado para antitoxina D alcançou o título preconizado no teste de soroneutralização em cobaios segundo Instrução Normativa n.23 (MAPA – Brasil,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

2002) de 2,0 UI/mL para anritoxina D, o que não foi alcançado para antitoxina C em que o título preconizado é de 5,0 UI/mL, e os títulos obtidos para qualquer um dos tratamentos foi 1,0 UI/mL.

Diferenças nos títulos de anticorpos obtidos entre as formulações testadas podem estar relacionadas à concentração dos antígenos utilizadas nas quimeras e no toxóide comercial. No caso das proteínas recombinantes utilizou-se uma concentração de 20 microgramas de cada proteína por dose, enquanto a falta de informação sobre a concentração de cada proteína no toxóide comercial impossibilita comparações.

Comparando-se apenas os resultados obtidos com as proteínas recombinantes, observa-se que a utilização do adjuvante aumentou o poder imunogênico do antígeno D, o que não aconteceu com o antígeno C. Um aumento na concentração do antígeno C nas formulações recombinantes poderia gerar resultados mais satisfatórios.

CONCLUSÃO

Os resultados encontrados nesse trabalho demonstraram que as quimeras recombinantes desenvolvidas foram imunogênicas, estimulando a produção de anticorpos neutralizantes e a construção de uma quimera bivalente obtida em sistema expressão de proteínas heterólogas como *E. coli* constitui economia de tempo e insumos uma vez que resulta de um único processo produtivo.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

REFERÊNCIAS

- ARAI, R. et al. Conformations of variably linked chimeric proteins evaluated by synchrotron X-ray small-angle scattering. **Proteins**, v.57, p.829-838, 2004.
- BENNETT, M. et al. DNA vaccination protects against botulinum neurotoxin type F. **Vaccine**, v.21, p.3110-3117, 2003.
- BRASIL. Instrução Normativa n.23, de 18 de março de 2002. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Diário Oficial 20/03/2002.
- BYRNE, M.P.; SMITH, L.A. Development of vaccines for prevention of botulism. **Biochimie**, v.82, p.955-966, 2000.
- CAI-QUN BIE. et al. Construction of non-covalent single-chain Fv dimers for hepatocellular carcinoma and their biological functions. **World Journal of Hepatology**, v.27, p.185-191, 2010.
- CLAYTON, M.A. et al. Protective vaccination with a recombinant fragment of Clostridium botulinum neurotoxin serotype A expressed from a synthetic gene in Escherichia coli. **Infection and Immunity**, v.63, p.2738-2742. 1995.
- CLAYTON, J.; MIDDLEBROOK, J.L. Vaccination of mice with DNA encoding a large fragment of botulinum neurotoxin serotype A. **Vaccine**, v.18, p.1855-1862, 2000.
- DA HORA, V.P. et al. Non-toxic derivatives of LT as potent adjuvants. **Vaccine**, v.29, p. 1538-1544, 2011.
- DePAZ, R.A. et al. Formulation of botulinum neurotoxin heavy chain fragments for vaccine development: mechanisms of adsorption to an aluminum – containing adjuvant. **Vaccine**, v.23, p.4029-4035, 2005.

1

2 DÖBEREINER J et al. Epizootic botulism of cattle in Brazil. **Dtsch. Tierärztl**
3 **Wschr.**v.99, p.188-190,1992.

4 DUTRA I.S.; DÖBEREINER J. Occurrence and distribution of *Clostridium*
5 *botulinum* in basins of rain-water captivation on cattle pasture. **7th Int. Symposium on**
6 **Microbial Ecology**, Santos, São Paulo, p. 180,1995.

7 DUTRA, I.S. et al. Surtos de botulismo em bovinos no Brasil associados à ingestão de
8 água contaminada. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, p.43-48, 2001.

9 DUTRA, I.S. et al. Botulismo em bovinos de corte e leite alimentados com cama de
10 frango. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, p. 115-119, 2005.

11 DUX, M.P. et al. Purification of a recombinant heavy chain fragment C vaccine
12 candidate against botulinum serotype C neurotoxin [rBoNT (Hc)] expressed in *Pichia*
13 *pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v.75, p.177-185, 2011.

14 FOYNES, S. et al. Vaccination against type F botulinum toxin using attenuated
15 *Salmonella enterica* var Typhimurium strains expressing the BoNT/F H(C) fragment.
16 **Vaccine**, v. 21, p. 1052-1059, 2003.

17 GEORGE, R.A.; HERINGA, J. An analysis of protein domain linkers: their
18 classification and role in protein folding. **Protein Engineering**, v.15, p.871-879, 2003.

19 HOLZHAUER M. et al. Botulism in dairy cattle in 2008: symptoms, diagnosis,
20 pathogenesis, therapy, and prevention. **Tijdschr Diergeneeskd**, v.134, p.564-570, 2009.

21 LEE, J.C. et al. C terminal half fragment (50 kDa) of heavy chain components of
22 *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxins can be used as an effective vaccine.
23 **Microbiology and Immunology**, v.51, p.445-455, 2007.

24

2 LOBATO, F.C.F. et al. Potência de toxóides botulínicos bivalentes tipos C e D
3 produzidos e comercializados no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**,
4 v.20, p.35-38, 1998.

5 LOBATO, F.C.F. et al. Anticorpos neutralizantes em bovinos vacinados com toxóides
6 botulínicos monovalentes e bivalentes tipos C e D. **Revista Brasileira de Medicina**
7 **Veterinária**, v.21, p.25-27, 1999.

8 LOBATO, F.C.F. et al. Botulismo em ruminantes causado pela ingestão de cama-de-
9 frango. **Ciência Rural**, v.38, p.1176-1178, 2008.

10 MONTECUCCO, C.; SCHIAVO, G. Mechanism of action of tetanus and botulism
11 neurotoxins. **Molecular Microbiology**, v.13, p.1-8, 1994.

12 PRIGENT, J. et al. Production and Characterisation of a Neutralising Chimeric
13 Antibody against Botulinum Neurotoxin A. **PLoS ONE**, v.5, p.1-10, 2010.

14 QI-LIANG, C. et al. Immunogenicity of polypeptide libraries assembled by epitope
15 shuffling: an approach to the development of chimeric gene vaccination against malaria.
16 **Vaccine**, v.23, p.267-277, 2004.

17 SHONE, C. et al. Bivalent recombinant vaccine for botulinum neurotoxin types A and
18 B based on a polypeptide comprising their effector and translocation domains that is
19 protective against the predominant A and B subtypes. **Infection and Immunity**, v.77,
20 p.2795-801, 2009.

21 SMITH, L.A. Botulism and vaccines for its prevention. **Vaccine**, v.27, p.33-39, 2009.

22 STERNE, M.; BATTY, I. Pathogenic Clostridia. Butterworths, Londres, 1975.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

TOKARNIA, C.H. et al. Botulismo em bovinos no Piauí, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.5, p.465-472, 1970.

WEBB, R.P. et al. Protection with recombinant *Clostridium botulinum* C1 and D binding domain subunit (Hc) vaccines against C and D neurotoxins. **Vaccine**, v.25, p.4273-4782, 2007.

WOODWARD, L.A. et al. Expression of HC Subunits from *Clostridium botulinum* Types C and D and Their Evaluation as Candidate Vaccine Antigens in Mice. **Infection and Immunity**, v.71, p.2941-2944. 2003.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

```

GGTACCCTCGAGTACTTCAATAATATTAATGATAGCAAAATTTCTGAGTCTGCAGAATCGCAAGAATACTCTGGTCGATACAAGT
GGTTATAATGCCGAGGTGAGCGAAGAAGGCGATGTCCAGCTGAATCCGATCTTCCCATTGACTTCAAGCTGGGCAGCAGTG
GTGAAGATCGCGGCAAAGTAATCGTGACCCAGAATGAGAACATCGTCTATAACAGCATGTATGAATCTTTTAGCATTAGCTTTT
GGATTTCGATTAATAAATGGGTGAGCAATCTGCCGGGCTATACGATTATCGACAGTGTAAAGAATAACAGCGGGTGGAGTAT
CGCATCATCAGTAACTTCTGGTCTTACGCTGAAGCAGAACGAAGATTCTGAACAGAGCATCAACTTTAGTTATGACATTAGT
AACAATGCTCCGGGCTACAATAAGTGGTCTTCTGACCCGTGACTAATAACATGATGGGTAACATGAAAATTTATATTAACGG
GAAACTGATTGACACCATCAAGGTGAAAGAAGTACCAGCATCAACTTCAGTAAGACGATCACATTTGAGATCAATAAGATCC
CGGATACGGGCTGATCACTTCTGATAGCGATAACATCAACATGTGGATTTCGATTTCTATATCTTCGCTAAAAGAAGTGGAC
GGCAAAGACATTAATATTCTGTTAACTCTCTGCAATATACCAACGTAGTAAAAGATTATTGGGGTAATGATCTGCGCTATAAT
AAAGAGTACTACATGGTAAACATCGATTATCTGAACCGCTATATGTATGCGAACAGCCGTCAAAATTGTATTAACACACGCCGT
AACAATAATGACTTTAATGAAGGGTATAAAATTTATCATCAAACGTATCCGTGGCAATACTAACGATACCCGCGTTCGCGGTGG
GGACATCCTGTACTTCGACATGACGATTAATAACAAAGCGTATAACCTGTTTATGAAGAACGAAAATATGTACGCAGACAACC
ATAGCACCGAGGATATTTACGCGATTGGCCTGCGTGAACAAACGAAAAGATTAATGATAATATTATCTTTTTCAGATTCACCAA
TGAATAATACCTATTATTACGCATCTCAGATCTTCAAATCTAACTCAATGGTAAAACATTTCTGGGATTTGCTCTATTGGTAC
ATACCGTTTTCGTCTGGGTGGTATTGGTATCGTCAACAACATCCGTTTCTTACAGTTAAACAAGGTAACACGCCAGCCTGC
TGGAATCTACCTCTACCCATTGGGGTTTTGTTCTGAGGGATCCGGTGGCGGTGAATTCCTCAATTCTATCAACGAC
AGCAAAATCCTGAGTCTGCAAAATAAGAAGAATGCACTGGTCGACACTTCTGGCTATAATGCTGAGGTTTCGTGTCGGTGACAA
CGTCCAGCTGAATACCATCTACACCAACGATTTCAAACCTGAGTAGCAGTGGTGATAAAATCATCGTCAACCTGAATAACAATAT
TCTGTACTCTGCGATCTATGAAAACAGTTCTGTGAGCTTCTGGATTAATAATCAGCAAAGATCTGACAACAGCCATAATGAATA
TACTATTATTAATAGCATCGAGCAGAATCTGGCTGGAAGCTGTGTATTCGTAACGGGAACATTGAATGGATTCTGCAAGACG
TGAATCGTAAATATAAGAGTCTGATCTTTGACTATTCTGAAAGTCTGTCTCACACAGGGTACACGAACAAATGGTTCTTTGTGA
CCATCACAATAACATCATGGGTATATGAAACTGTACATTAATGGTGAACGAAACAGTCTCAGAAAATTGAAGACCTGGATG
AAGTTAAGCTGGACAAGACCATTGTGTTGGCATCGACGAGAATATCGATGAGAACCAGATGCTGGATTTCGCGATTTCAAT
ATCTTTAGCAAAGAGCTGTCTAATGAAGATATTAATATCGTTTACGAAGGCCAAATCCTGCGTAATGTTATCAAGGACTATTGG
GGCAATCCGCTGAAATTCGATACAGAGTACTATATCATTAAACGATAATTATATTGACCCTACATCGCGCCAGAAAGTAACGT
GCTGGTTCTGGTACAGTATCCTGATCGCAGCAAACCTGTATACCGGCAACCCGATCACTATCAAAAGTGTGAGCGATAAGAATC
CTTACAGCCGATCTGAACGGCGATAATATTATCTGCATATGCTGTACAATTCTCGCAAATATATGATTATTCGCGATACCG
ATACAATTTATGCGACCCAGGGCGGGGAGTGTAGTCAAAATTCGCTGTACGCACTGAAACTGCAATCTAACCTGGGTAACCTA
CGGTATTGGTATTTCTCTATTAAGAACATTGTAAGCAAGAACAATATTGCAGCCAGATCTTTAGCAGCTTTCGTGAAAACAC
GATGCTGCTGGCTGATATTTATAAACCATGGCGTTTTAGTTTCAAGAACGCCTATACGCCGGTAGCCGTAACGAACCTATGAAA
CGAAACTGCTGAGTACTAGCAGCTTTTGAAAATTTATTAGCCGTGATCCGGGTTGGGTTGAGAAAGCTTTGA

```

Em **negrito**, sítios para enzimas de restrição (*KpnI*, *XhoI*, *BamHI*, *EcoRI* e *HindIII*, respectivamente); em **amarelo**, DLRN^C; em **verde**, *linker* de glicinas; em **azul**, DLRN^D e; em **vermelho**, *stop* códon.

17 Figura 1. Sequência do gene sintético contendo as regiões codificadoras para expressão
18 dos domínios DLRN^C e DLRN^D das NBOTs C e D.

19
20
21
22
23
24

VETOR DE ORIGEM	INSERTO	ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	VETOR DE CLONAGEM	VETOR COM INSERTO	PROTEÍNA RECOMBINANTE
pUC19/ <i>c-d</i>	<i>c-d</i>	<i>XhoI</i> e <i>HindIII</i>	pAE	pAE/ <i>c-d</i>	rC-D
pUC19/ <i>c-d</i>	<i>c-d</i>	<i>KpnI</i> e <i>HindIII</i>	pAE/ <i>ltb</i>	pAE/ <i>ltb-c-d</i>	rLTB-C-D
pUC19/ <i>c-d</i>	<i>c</i>	<i>XhoI</i> e <i>EcoRI</i>	pAE	pAE/ <i>c</i>	rC
pUC19/ <i>c-d</i>	<i>d</i>	<i>BamHI</i> e <i>HindIII</i>	pAE	pAE/ <i>d</i>	rD

2

3 Tabela 1. Vetores, insertos, enzimas de restrição e produtos obtidos na clonagem das
4 proteínas recombinantes rC-D, rLTB-C-D, rC e rD.

5

6

7

8

9

10

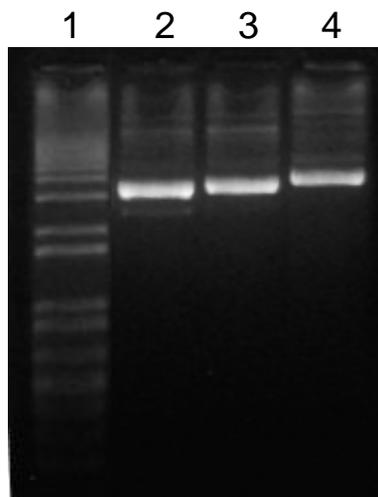
11

12

13

14

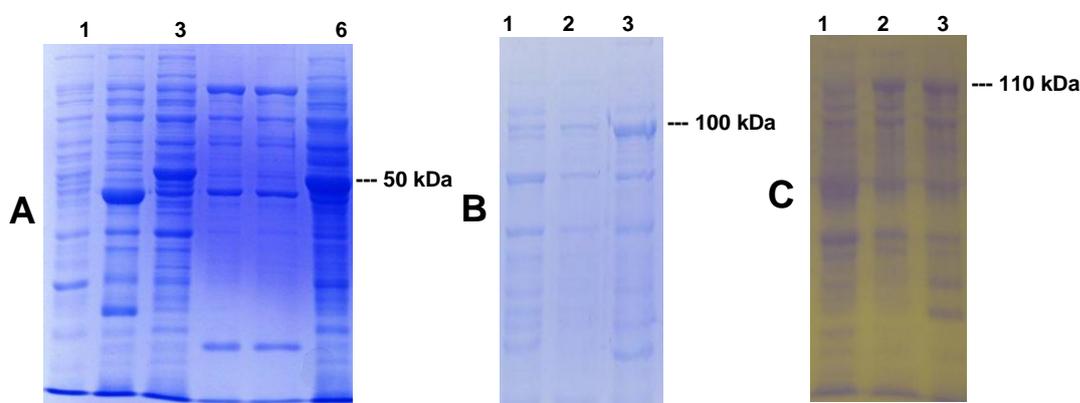
1
2
3
4
5
6
7
8
9



10 Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1% dos vetores usados neste trabalho. 1.
11 marcador 1Kb DNA ladder (Invitrogen); 2: Vetor pUC19/*c-d* (~5215pb); 3. pAE/*c-d*
12 (~5400pb); 4. pAE/*ltb-c-d* (~5700pb).

13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

1
2
3
4
5
6
7
8
9



10 Figura 3. SDS-PAGE 12% da expressão dos antígenos recombinantes produzidos em *E.*
 11 *coli*. A- rC e rD, 1- extrato de *E. coli* BL21 (DE3) Star não transformada; 3- extrato de
 12 *E. coli* BL21 (DE3) Star transformada com pAE-*c* após indução com IPTG; 6- extrato
 13 de *E. coli* BL21 (DE3) Star transformada com pAE-*d* após indução com IPTG. B- rC/D,
 14 1- extrato de *E. coli* BL21 (DE3) Star não transformada; 2- extrato de *E. coli* BL21
 15 (DE3) Star transformada com pAE-*c/d* antes da indução com IPTG; 3- extrato *E. coli*
 16 BL21 (DE3) Star transformada com pAE-*c/d* após indução com IPTG. C- rLTB-C-D, 1-
 17 extrato de *E. coli* BL21 (DE3) Star não transformada; 2- extrato de *E. coli* BL21 (DE3)
 18 Star transformada com pAE-*ltb/c-d* antes da indução com IPTG; 3- extrato de *E. coli*
 19 BL21 (DE3) Star transformada com pAE-*ltb/c-d* após indução com IPTG.

20
21
22
23
24
25

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

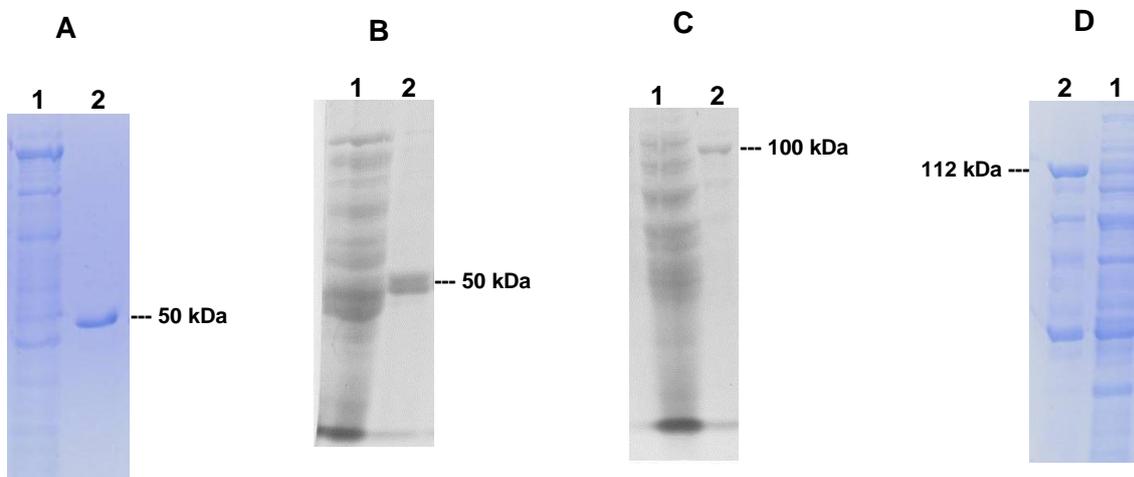
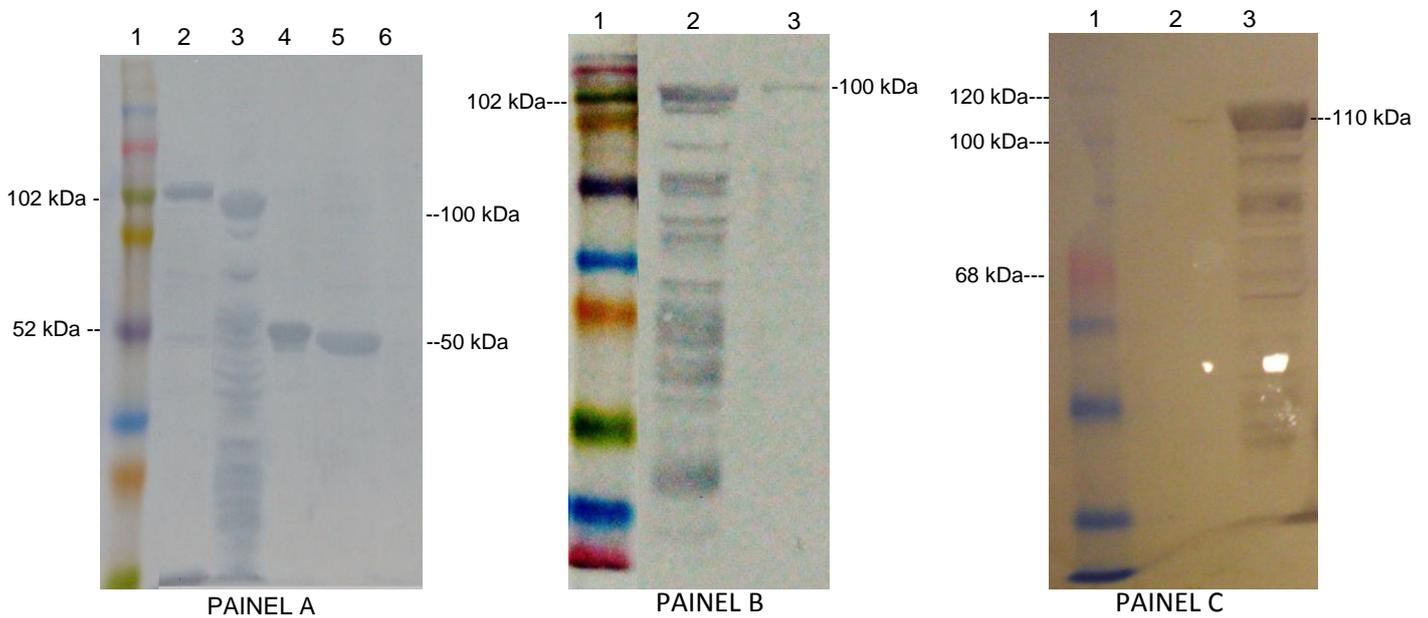
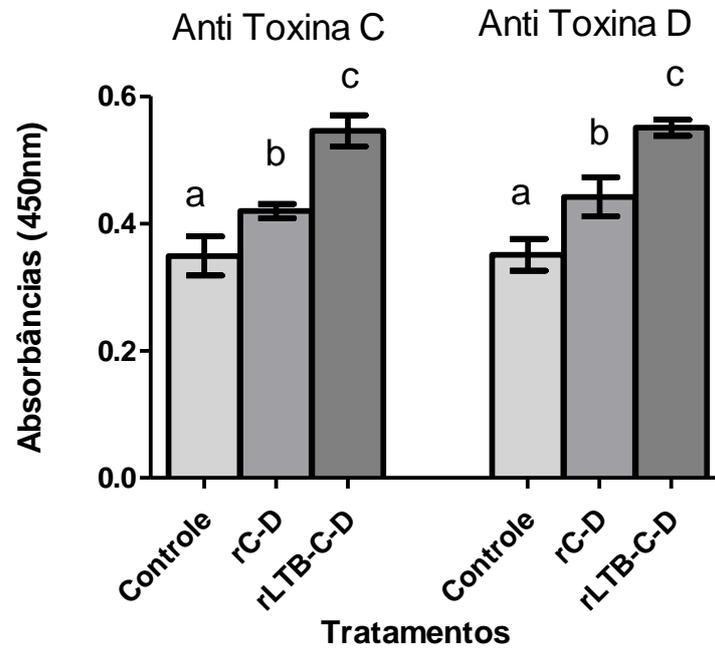


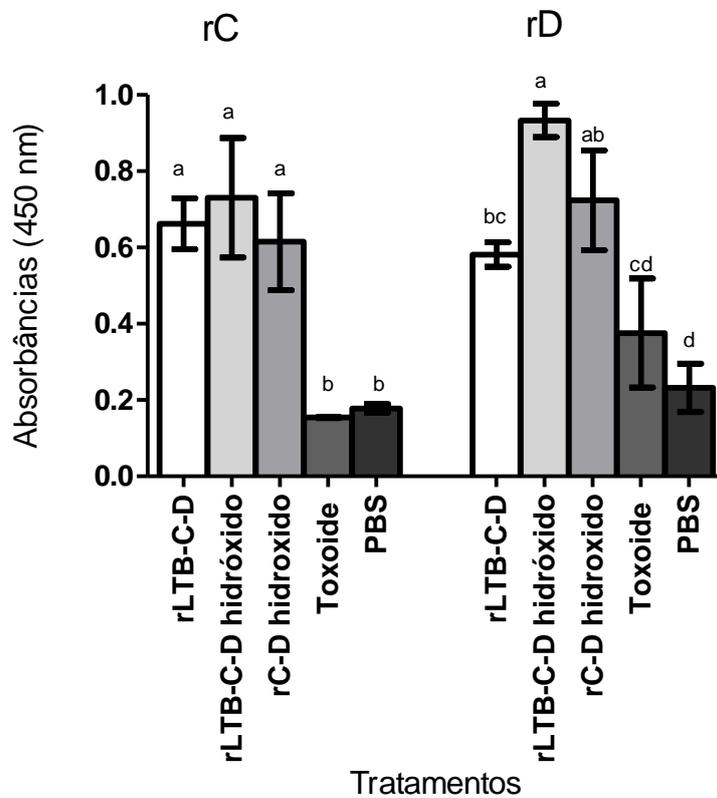
Figura 4. SDS-PAGE 10% dos antígenos recombinantes purificados mediante cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose. A- rC; B- rD; C- rC-D; D- rLTB-C-D. 1- extrato de *E. coli* BL21 (DE3) Star não transformada; 2- antígenos recombinantes purificados.



13 Figura 5. A) *Western blot* com MAb anti-6xHis da rLTB-C-D, rC-D, rC e rD. 1:
 14 marcador pré corado Rainbow Ladder (Amershan); 2: rLTB-C-D purificada (112 kDa);
 15 3: Pellet cultivo expressão rC-D (100 kDa); 4: rC (50 kDa); 5: rD (50 kDa); 6: extrato
 16 de *E.coli* Star não transformada. B) *Western blot* com MAb anti-6xHis da rC-D. 1:
 17 marcador pré corado Rainbow Ladder (Amershan); 2: rC-D cultivo induzido; 3. rC-D
 18 (100 kDa) purificada. C) *Western blot* com soro de coelho anti CT. 1: Marcador de
 19 massa molecular; 2: extrato de *E. coli* Star não transformada; 3: rLTB-C-D purificada.



4 Figura 6. Absorbâncias em ELISA das proteínas recombinantes rLTB-C-D e rC-D,
5 determinadas com antitoxinas botulínicas C e D, utilizando como controle negativo
6 extrato de *E.coli* BL21 (DE3) . *letras diferentes representam diferença estatística
7 significativa ($p \leq 0,05$).



4 Figura 7. Absorbâncias por ELISA do *pool* de soros na diluição 1/1600 de
 5 camundongos vacinados com rLTB-C-D, rLTB-C-D com hidróxido de alumínio, rC-D
 6 com hidróxido de alumínio, vacina comercial e grupo controle, contra as proteínas
 7 recombinantes rC e rD. *letras diferentes representam diferenças estatísticas
 8 significativas ($p \leq 0,05$).

Tratamento	Antitoxina Botulínica C	Antitoxina Botulínica D
rLTB-C-D	2 UI/mL	1 UI/mL
rLTB-C-D + hidróxido de alumínio	2 UI/mL	2 UI/mL
r-C-D + hidróxido de alumínio	2 UI/mL	1 UI/mL
Toxóide comercial	5 UI/mL	1 UI/mL
Controle negativo	ND	ND

ND = não detectável

Tabela 2: Nível de anticorpos neutralizantes em unidades internacionais por mililitro (UI/mL) de antitoxina botulínica C e antitoxina botulínica D em *pool* de soros de camundongos imunizados, por meio da técnica soroneutralização em camundongos.

3 Conclusão

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- Foi possível clonar e expressar as quimeras propostas em *Escherichia coli*;
- As quimeras foram antigênicas e imunogênicas;
- A LTB apresentou atividade adjuvante;
- As quimeras induziram a produção de anticorpos neutralizantes em camundongos

Bibliografia

ARAI, R., WRIGGERS, W.; NISHIKAWA, Y.; NAGAMUNE, T.; FUJISAWA, T. Conformations of variably linked chimeric proteins evaluated by synchrotron X-ray small-angle scattering. **Proteins**. v.57, p.829-838, 2004.

ARNON S.S et al. Botulinum Toxin as a Biological Weapon: Medical and Public Health Management [Electronic version]. **The Journal of American Medical Society**, v. 285, p. 1059-1070, 2001.

ATASSI M.Z., OSHIMA M. Structure, activity, and immune (T and B cell) recognition of botulinum neurotoxins, **Critical Reviews in Immunology**, v. 19 p. 219–260, 1999.

CONCEIÇÃO, F.R.; MOREIRA, A.N.; DELLAGOSTIN, O.A. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of Mycoplasma hyopneumoniae P97 adhesin with Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. **Vaccine**, v.24, p.5734-43, 2006

BALDWIN, M.R.; TEPP, W.H.; PRZEDPELSKI, A.; PIER C.L.; BRADSHAW, M.; JOHNSON, E.A.; BARBIERI, J.T. Subunit vaccine against the seven serotypes of botulism. **Infection and Immunity**, v.76, p.1314-1318, 2008.

BENNETT, M.; PERKINS, S.D.; HOLLEY, J.L. DNA vaccination protects against botulinum neurotoxin type F. **Vaccine**, v.21, p.3110-3117, 2003.

BIBERSTEIN, E.L.; HIRSH, D.C. Os clostrídios. In: HIRSH, D. C. & ZEE, Y. C. **Microbiologia veterinária**, Guanabara Koogan, 2003. p.226-228.

BONILHA, M.M.; LEMOS, R.A.A. Botulismo. In: LEMOS R.A.A. (Ed.). **Principais enfermidades de bovinos de corte do Mato Grosso do Sul**. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 1998. p.59-76.

BÖHNEL, H.; WAGNER, C.; GESSLER, F. Tonsils – Place of botulinum toxin production: Results of routine laboratory diagnosis in farm animals. **Veterinary Microbiology**, v.130, p.403-409, 2008.

BRASIL. Instrução Normativa n.15, de 17 de julho de 2001. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Diário Oficial n. 138, Seção 1, de 18.7.2001.

BRASIL. Instrução Normativa n.23, de 18 de março de 2002. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Diário Oficial 20/03/2002.

BYRNE, M.P.; SMITH, T.J.; MONTGOMERY, V.A.; SMITH, L.A. Purification, potency, and efficacy of the botulinum neurotoxin type A binding domain from *Pichia pastoris* as a recombinant vaccine candidate. **Infection and Immunity**, v.66, p.4817-4822, 1998.

BYRNE, M.P.; SMITH, L.A. Development of vaccines for prevention of botulism. **Biochimie**, v.82, p.955-966, 2000.

BYRNE, M.P.; TITBALL, R.W.; HOLLEY, J.; SMITH, L.A. Fermentation, purification, and efficacy of a recombinant vaccine candidate against botulinum neurotoxin type F from *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v18, p.327-337, 2000.

CAI-QUN B.; DONG-HUA Y.; XU-JING L.; SHAO-HUI T.. Construction of non-covalent single-chain Fv dimers for hepatocellular carcinoma and their biological functions. **World Journal of Hepatology**, v.2, p.185-191, 2010.

CDC. Notice of CDC's Discontinuation of Investigational Pentavalent (ABCDE) Botulinum Toxoid Vaccine for Workers at Risk Occupational Exposure to Botulinum Toxin. **MMRW**, 2011; v.60 (42), p.1452.

CLAYTON, M.A.; CLAYTON, J.M.; BROWN, D.R.; MIDDLEBROOK, J.L. Protective vaccination with a recombinant fragment of *Clostridium botulinum* neurotoxin serotype A expressed from a synthetic gene in *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.63, p.2738-2742, 1995.

CLAYTON, J.; MIDDLEBROOK, J.L. Vaccination of mice with DNA encoding a large fragment of botulinum neurotoxin serotype A. **Vaccine**, v.18, p.1855-1862, 2000.

DA HORA, V.P.; CONCEIÇÃO, F.R.; DELLAGOSTIN, O.A.; DOOLAN, D.L. Non-toxic derivatives of LT as potent adjuvants. **Vaccine**, v.29, p.1538-1544, 2011.

DePAZ, R.A.; HENDERSON, I.; ADVANT, J.S. Formulation of botulinum neurotoxin heavy chain fragments for vaccine development: mechanisms of adsorption to an aluminum – containing adjuvant. **Vaccine**, v.23, p.4029-4035, 2005.

DÖBEREINER J.; TOKARNIA C.H.; LANGENEGGER J.; DUTRA I.. Epizootic botulism of cattle in Brazil. **Dtsch. Tierärztl. Wschr.**v.99, p.188-190,1992.

DUTRA, I.S.; DÖBEREINER, J. Fatos e teorias sobre a "doença da vaca caída": botulismo. **A Hora Veterinária**, v.14, p.7-10, 1995.

- DUTRA I.S.; DÖBEREINER J. Occurrence and distribution of *Clostridium botulinum* in basins of rain-water captivation on cattle pasture. **7th Int. Symposium on Microbial Ecology**, Santos, São Paulo, p. 180,1995
- DUTRA, I.S.; DÖBEREINER, J.; ROSA, I.V.; SOUZA, L.A.A.; NONATO, M. Surtos de botulismo em bovinos no Brasil associados à ingestão de água contaminada. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, p.43-48, 2001.
- DUTRA, I.S.; DÖBEREINER, J.; SOUZA, A.M.; Botulismo em bovinos de corte e leite alimentados com cama de frango. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, p. 115-119, 2005.
- DUX, M.P.; HUANG, J.; BARENT, R.; INAN, M.; SWANSON, S.T.; SINHA, J.; ROSS, J.T.; SMITH, L.A.; SMITH, T.J.; HENDERSON, I.; MEAGHER, M.M.. Purification of a recombinant heavy chain fragment C vaccine candidate against botulinum serotype C neurotoxin [rBoNT (Hc)] expressed in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v.75, p.177-185, 2011.
- FERNANDES, C.G. Botulismo. In: CORREA, R.F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C.; et al. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. 2 ed. São Paulo: Livraria. Varela, 2001. 426p.
- FOYNES, S. HOLLEY, J.L.; GARMORY H.S.; TITBALL R.W.; FAIRWEATHER N.F.. Vaccination against type F botulinum toxin using attenuated *Salmonella enterica* var Typhimurium strains expressing the BoNT/F H(C) fragment. **Vaccine**, v. 21, p. 1052-1059, 2003.
- GEORGE, R.A.; HERINGA, J. An analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding. **Protein Engineering**, v.15, p.871-879, 2003.
- Gil TURNES, C.; LANGENEGGER, J.; SCARSI, R.M. Mal de Alegrete: Evidencias de *Clostridium botulinum* D como agente etiológico. In: ANAIS XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINARIA. BELÉM, PA, 1984.
- HOLZHAUER M.; ROEST, H.I.; de JONG, M.G.; VOS, J.H; Botulism in dairy cattle in 2008: symptoms, diagnosis, pathogenesis, therapy, and prevention. *Tijdschr Diergeneeskd*, v.134, p.564-570, 2009.
- HATHEWAY, C.L. Toxigenic clostridia. **Clinical Microbiology Reviews**, v.3, p. 66-98, 1990.
- KIYATKIN, N.; MAKSYMOWYCH, A.B.; SIMPSON, L.L. Induction of an immune response by oral administration of recombinant botulinum toxin. **Infection and Immunity**, v.65, p.4586-4591, 1997.

- LANGENEGGER, J., DÖBEREINER, J., TOKARNIA, C. H. Botulismo epizootico em bovinos no Brasil. **Agroquímica**, v.20, p.22-26, 1983.
- LANGENEGGER, J., SOUZA, A.M. Esporos de *Clostridium botulinum* em torno de cadáveres decompostos de bovinos em pastagens no sul de Goiás. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.7, p.17-22, 1987.
- LEE, J.C.; HWANG, H.J.; SAKAGUCHI, Y.; YAMAMOTO, Y.; ARIMITSU, H.; TSUJI, T.; WATANABE, T.; OHYAMA, T.; TSUCHIYA, T.; OGUMA, K. C-terminal half fragment (50 kDa) of heavy chain components of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxins can be used as an effective vaccine. **Microbiology and Immunology**, v.51, p.445-55, 2007.
- LISBOA, J.A.; KUCHENBUCK, M.R.G.; DUTRA, I.S.; GONÇALVES, R.C.; ALMEIDA, C.T.; BARRIS FILHO, I.R. Epidemiologia e quadro clínico do botulismo epizootico dos bovinos no estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.16, p.67-74, 1996.
- LOBATO, F. C. F. ET AL. Potência de toxóides botulínicos bivalentes tipos C e D produzidos e comercializados no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.20, p.35-38, 1998.
- LOBATO, F.C.F.; ALMEIDA, A.C.; ABREU, V.L.V.; SILVA, N.; NASCIMENTO, R.A.; MARTINS, N.E. Anticorpos neutralizantes em bovinos vacinados com toxóides botulínicos monovalentes e bivalentes tipos C e D. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.21, p.25-27, 1999.
- LOBATO, F.C.F.; SALVARANI, F.M.; SILVA, R.O.S.; ALMEIDA, A.C.; SOUZA, A.M.; LIMA, C.G.R.D.; PIRES, P.S.; ASSIS, R.A.; AZEVEDO, E.O. Botulismo em ruminantes causado pela ingestão de cama-de-frango. **Ciência Rural**, v.38, p.1176-1178, 2008.
- MÉNDEZ, M.C.; RIET-CORREA, F.; SCHILD A.L.; FERREIRA, J.L.M. Laboratório Regional de Diagnóstico. Doenças diagnosticadas no ano de 1986, Editora e Gráfica Universitária, Pelotas, p.40, 1987.
- MONTECUCCO, C.; SCHIAVO, G. Mechanism of action of tetanus and botulism neurotoxins. **Molecular Microbiology**, v.13, p.1-8, 1994.
- PRIGENT, J.; MAZUET, C.; BOQUET, D.; LAMOURETTE, P.; VOLLAND, H.; POPOFF, M.R.; CRÉMINON, C.; SIMON, S. Production and Characterisation of a Neutralising Chimeric Antibody against Botulinum Neurotoxin A. **PLoS ONE** v.5, p.1-10, 2010.

- QI-LIANG, C.; FANG, W.; YA-HUI, L.; DING-DING, S.; HENG, W. Immunogenicity of polyepitope libraries assembled by epitope shuffling: an approach to the development of chimeric gene vaccination against malaria. **Vaccine**, v.23, p.267-277, 2004.
- RAVICHANDRAN, E.; AL-SALEEM, F.H.; ANCHARSKI, D.M.; ELIAS, D.M.; SINGH, A.K.; SHAMIN, M.; GONG, Y.; SIMPSON, L.L. Trivalent vaccine against botulinum toxin serotypes A, B, and E that can be administered by the mucosal route. **Infection and Immunity**. v.75, p.3043-3054, 2007.
- RIET-CORREA, F.; GEVEHR, C.F. Botulismo. In: RIET-CORREA et al. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**, Pallotti, 2007. 3ª edição vol.1 p.215 – 224.
- ROBERTS, R.S. Clostridial diseases. In: STABLEFORTH, A.W., GALLOWAY, I.A. **Infectious diseases of animals – Diseases due to bacteria**, Butterworths Scientific Publications, 1959. Volume I, p.209-228.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2001. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SIMPSON, L.L. Molecular pharmacology of botulinum toxin and tetanus toxin. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.26, p.427-53, 1986.
- SOBEL, J. Botulism. **Clinical Infectious Disease**, v.41, p.1167-73, 2005.
- SOUZA, A. M.; LANGENEGGER, J. Esporos de Clostridium botulinum em torno de cadáveres decompostos de bovinos em pastagens no Sul de Goiás. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.7, p.17-22, 1987.
- SHONE, C.; AGOSTINI, H.; CLANCY, J.; GU, M.; YANG, H.; CHU, Y.; JOHNSON, V.; TAAL, M.; MCGLASHAN, J.; BREHM, J.; TONG, X. Bivalent recombinant vaccine for botulinum neurotoxin types A and B based on a polypeptide comprising their effector and translocation domains that is protective against the predominant A and B subtypes. **Infection and Immunity**, v.77, p.2795-2801, 2009.
- SHYU, R.H.; SHAIQ M.F.; TANG S. S.; SHYU H. F.; LEE C. F.; TSAI M. H.; SMITH J. E.; HUANG H. H.; WEY J. J.; HUANG J. L.; CHANG H. H. DNA vaccination using the fragment C of botulinum neurotoxin type A provided protective immunity in mice. **Journal of Biomedical Science**, v.7, p.51–57, 2000.
- SMITH, L.A. Botulism and vaccines for its prevention. **Vaccine**, v.27, p.33-39, 2009.

STEINMAN, A.; GALON, N.; ARAZI, A.; BAR-GIORA, Y.; SHPIGEL, N.Y. Cattle immune response to botulinum type D toxoid: Results of a vaccination study. **Vaccine**, v.25, p.7636-7640, 2007.

STERNE, M.; BATTY, I. Pathogenic Clostridia. Butterworths, Londres, 1975.

TOKARNIA, C.H.; LANGENEGGER, J.; LANGENEGGER, C.H.; CARVALHO, E.V. Botulismo em bovinos no Piauí, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.5, p.465-472, 1970.

WEBB, R.P.; SMITH, T.J.; WRIGHT, P.M.; MONTGOMERY, V.A.; MEAGHER, M.M.; SMITH, L.A. Protection with recombinant *Clostridium botulinum* C1 and D binding domain subunit (Hc) vaccines against C and D neurotoxins. **Vaccine**, v.25, p.4273-4782, 2007.

WHITLOCK, R.H. Neurotoxicogenic clostridia. In: GYLES, C.L. et al. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**, Blackwell Publishing, 2004. 3rd Edition, cap.11, p.117-124.

WOODWARD, L.A., ARIMITSU, H., HIRST, R.; OGUMA, K.. Expression of HC Subunits from *Clostridium botulinum* Types C and D and Their Evaluation as Candidate Vaccine Antigens in Mice. **Infection and Immunity**, v.71, p.2941-2944, 2003.

YARI, K.; FATEMI, S.S.; TAVALLAEI, M. Optimization of the BoNT/ A – Hc expression in recombinant *Escherichia coli* using the Taguchi statistical method. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.56, p.35-42, 2010.

ZICHEL, R.; MIMRAN A.; KEREN A.; BARNEA A.; STEINBERGER-LEVY I.; MARCUS D.; TURGEMAN A.; REUVENY S. Efficacy of a Potential Trivalent Vaccine Based on Hc Fragments of Botulinum Toxins A, B, and E Produced in a Cell-Free Expression System. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.17, p.784-792, 2010.