

AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *Paeniclostridium sordellii* EM CAMUNDONGOS

FLÁVIA ROCHA MEDEIROS¹; RAFAEL RODRIGUES RODRIGUES²; PEDRO
HENRIQUE DALA NORA QUATRIN³, MARIANA BARROS DEUNER⁴,
WELINGTON MATEUS PINTO DE MORAES⁵, FABRICIO ROCHEDO
CONCEIÇÃO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – rochamedeirosflavia@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – rafaelr458@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – quatrinp@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – marianabarros135@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – welingtonmateuspdemoraes@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A criação de gado tem sido essencial para a economia global, mas enfrenta desafios devido a doenças graves causadas por bactérias do gênero *Clostridium* (HATHEWAY, 1990; LOBATO et al., 2013), como o *Paeniclostridium sordellii*, responsável por morte súbita, abomasite, enterite hemorrágica, infecções gastrointestinais e gangrena gasosa em animais (NYAOKE et al., 2020).

As toxinas hemorrágica (TcsH) e letal (TcsL) são os principais fatores de patogenicidade de *P. sordellii*, desempenhando um papel crucial na patogênese ao destruir e desestruturar o citoesqueleto das células hospedeiras. (ALDAPE et al., 2006; VIDOR et al., 2015). Estas toxinas consistem em pelo menos quatro domínios funcionais diferentes: GTD (domínio de glicosiltransferase), CPD (domínio de autoprotease), DRBD (domínio transmembranar e de ligação ao receptor) e CROPS (domínio combinado de oligopeptídeos repetitivos) (Zhou et al., 2024).

Entre as toxinas, cepas produtoras de TcsL são mais frequentemente associadas a surtos em animais de campo do que cepas produtoras de TcsH (THIELE et al., 2013). Além disso, essa toxina está presente em vacinas comerciais, sendo um alvo relevante para a imunização e controle de infecções causadas por *P. sordellii* (AMIMOTO et al., 2001; THIELE et al., 2013). Contudo, as vacinas comerciais apresentam limitações, como baixa imunogenicidade processo de cultivo laborioso das bactérias anaeróbicas e níveis elevados de biossegurança, o que impulsiona a busca por alternativas para imunização (LOBATO et al., 2004; FERREIRA et al., 2016).

Atualmente, as estratégias mais promissoras para o desenvolvimento de vacinas utilizam antígenos recombinantes com alta capacidade de induzir resposta imunológica, incorporando os domínios imunoprotetores das toxinas (FERREIRA et al., 2016). Domínios atóxicos de toxinas podem ser co-expressos ou fusionados, o que reduz a quantidade de etapas no processo de produção e os custos do imunizante (RODRIGUES et al., 2021). Além disso, o uso de cepas não patogênicas de *Escherichia coli* permite um controle mais preciso das condições de expressão, tornando a produção mais segura e economicamente viável (FERREIRA et al., 2016). Nesse contexto, o presente estudo foca no desenvolvimento de uma vacina recombinante contendo domínios imunorelevantes da toxina TcsL de *P. sordellii*, com o objetivo de avaliar sua imunogenicidade em camundongos.

2. METODOLOGIA

Três domínios distintos da toxina TcsL de *P. sordellii* foram analisados e projetados por meio da bioinformática. Genes sintéticos otimizados para os antígenos recombinantes rD1, rD2 e rD3 foram sintetizados pela *Epoch Life Science* (Texas, USA) e clonados no vetor pET28a, conforme o método descrito por Moreira et al. (2016).

Para a expressão, os plasmídeos foram transformados em cepas de *E. coli* BL21 (DE3) através de choque térmico (5 min no gelo, 1 min 42 °C e 5 min no gelo) e as células transformadas foram cultivadas por 1 h (37 °C, 150 RPM) em meio LB. Após, o cultivo foi transferido para 50 mL de LB suplementado com 100 µg/mL de canamicina e cultivado sob agitação overnight (37 °C, 150 RPM). No outro dia, todo volume foi transferido novamente para 450 mL de LB acrescido do respectivo antibiótico e cultivado (37 °C, 150 RPM) até $DO_{600nm} = 0,6$ a $0,8$, onde a expressão das proteínas foi induzida com 0,5 mM de isopropil-β-D-1- thiogalactopiranosídeo (IPTG). Após a expressão, uma alíquota de 1 mL do cultivo foi coletada e as amostras foram centrifugadas (7.000 x g, 2 min) e o pellet usado para avaliar o nível de expressão.

A solubilidade das proteínas foi verificada após lise celular com lisozima (100 mM) e sonicação (7 ciclos de 15s, com amplitude de 40), seguida de purificação em coluna de Ni-Sepharose por cromatografia de afinidade, utilizando o sistema automatizado ÄKTAprime® da GE Healthcare, e do processo de diálise para remoção de ureia. A quantificação das proteínas foi feita utilizando o método BCA™ Protein Assay (Pierce) e a análise conduzida no software TotalLabquant®. A expressão e a solubilidade foram avaliadas por SDS-PAGE 12%.

Para as formulações antigênicas, as proteínas purificadas foram coadministradas (50 µg por dose) e misturadas ao adjuvante hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) (15%), que foi adsorvido às formulações vacinais a 4 °C por 16 horas, utilizando solução salina como diluente. Os testes de esterilidade para detecção de bactérias e fungos contaminantes seguiram o procedimento recomendado pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), conforme a Portaria 49/1997.

O teste de desafio foi feito por imunização de camundongos Balb/c (4 a 6 semanas de idade), via subcutânea, divididos em 4 grupos de 3 a 5 animais cada. Os animais foram imunizados nos dias 0, 14 e 28 com 0.5 mL, e o sangue coletado para obtenção do soro nos dias 0, 27 e 35. Após, no dia 36 os animais foram desafiados via intraperitoneal com 1 e 16 DL₁₀₀ de sobrenadante de *P. sordellii*. Os animais inoculados foram observados por 7 dias, registrando-se as mortes ocorridas no período. O sangue dos animais foi centrifugado (3.000 xg 7min) e o pool de cada grupo foi utilizado para avaliação de anticorpos por ELISA indireto, conforme as etapas descritas por Rodrigues et al., 2021. Por fim, os animais sobreviventes foram posteriormente eutanasiados com overdose de anestésico barbitúrico (150 mg/kg).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A combinação dos antígenos recombinantes rD1, rD2 e rD3 em camundongos desafiados gerou níveis elevados de anticorpos IgG após a última dose em comparação ao grupo controle (Figura 1), resultando em uma taxa de sobrevivência de 100% contra as doses letais 1DL₁₀₀ e 16DL₁₀₀ (Tabela 1), sem apresentar sintomas ao desafio com a toxina. Em contraste, os grupos controle, tratados apenas com adjuvante + PBS, não apresentaram proteção, com sintomas

graves como ataxia e desidratação, e alta mortalidade dentro do período de avaliação.

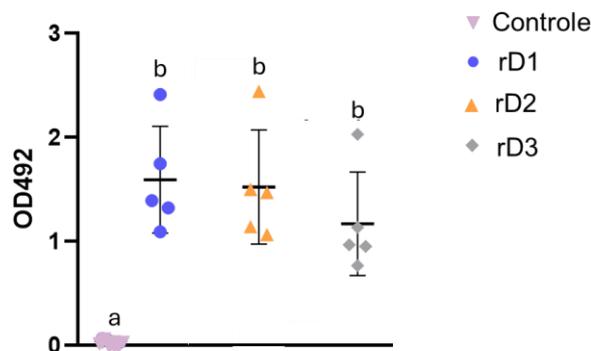


Figura 1. Níveis séricos de IgG total anti-rD1, anti-rD2 e anti-rD3 estimulados pela vacina purificada, determinados por ELISA indireto. A comparação foi realizada entre os soros de camundongos do grupo controle (dia 35) e dos grupos vacinados com rD1, rD2 e rD3 purificados e coadministrados, após três doses, destacando os níveis de imunoglobulinas detectados contra cada antígeno individual (rD1, rD2 e rD3) ($p < 0,05$).

Tabela 1. Proteção da vacina rD1 + rD2 + rD3 purificada contra desafio letal com sobrenadante de cultivo de *P. sordellii*.

Grupos	Vacina	Nº de animais	Sobrevivência (%)	DL ₁₀₀
1	rD1 + rD2 + rD3	5	100	1
2	Controle	*4	0	1
3	rD1 + rD2 + rD3	5	100	16
4	Controle	*3	0	16

* O grupo foi adaptado de acordo com a disponibilidade de animais para a condução do experimento.

4. CONCLUSÕES

As formulações de vacinas recombinantes mostraram-se promissoras do ponto de vista imunológico como antígenos solúveis e purificados, proporcionando proteção contra o sobrenadante de cultivo de *P. sordellii* contendo TcsL. Pesquisas futuras devem identificar quais domínios são essenciais para a produção de anticorpos neutralizantes. Esses resultados reforçam o potencial de antígenos recombinantes no desenvolvimento de vacinas contra *P. sordellii*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDAPE, M. J.; BRYANT, A. E.; STEVENS, D. L. Clostridium sordellii infection: epidemiology, clinical findings, and current perspectives on diagnosis and treatment. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 43, n. 11, p. 1436–1446, 2006.
- AMIMOTO, K. et al. Protective effects of clostridium sordellii LT and HT toxoids against challenge with spores in guinea pigs. **The Journal of veterinary medical science**, v. 63, n. 8, p. 879–883, 2001.
- ANK, T.; AKTORIES, K. Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. **Trends in microbiology**, n. 5, p. 222–229, 2008.
- CARTER, G. P. et al. TcsL is an essential virulence factor in Clostridium sordellii ATCC 9714. **Infection and immunity**, v. 79, n. 3, p. 1025–1032, 2011.
- FERREIRA, M. R. A. et al. Recombinant alpha, beta, and epsilon toxins of Clostridium perfringens: Production strategies and applications as veterinary vaccines. **Toxins**, v. 8, n. 11, p. 340, 2016.
- GENTH, H.; JUST, I. **Large clostridial glycosylating toxins modifying small GTPases. The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins**. [s.l.: s.n.].
- GENY, B. et al. Clostridium sordellii lethal toxin kills mice by inducing a major increase in lung vascular permeability. **The American journal of pathology**, v. 170, n. 3, p. 1003–1017, 2007.
- HATHEWAY; TOXIGENIC CLOSTRIDIA, C. L. Livestock science, v. 253, n. 104704. **Clinical microbiology reviews**, n. 1, p. 66–98, 1990.
- JUST, I.; HOFMANN, F.; AKTORIES, K. Molecular mechanisms of action of the large clostridial cytotoxins. Em: **Bacterial Protein Toxins**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2000. p. 307–331.
- LOBATO, F. C. F. et al. Eficácia de vacinas comerciais contra clostridioses frente ao desafio com Clostridium sordellii. **Ciência Rural**, v. 34, p. 439-442, 2004.
- MOREIRA, G. M. S. G. Immunogenicity of a trivalent recombinant vaccine against Clostridium perfringens alpha, beta, and epsilon toxins in farm ruminants. Scientific reports. **BMC infectious diseases**, 2016.
- NYAOKE, A. C. Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc. v. 32, p. 239–245, 2020.
- RODRIGUES, R. R. **Evaluation of the expression and immunogenicity of four versions of recombinant Clostridium perfringens beta toxin designed by bioinformatics tools. Anaerobe**, v. 69, n. 102326. [s.l.: s.n.].
- THIELE, T. L.; STUBER, T. P.; HAUER, P. J. Detection of Clostridium sordellii strains expressing hemorrhagic toxin (TcsH) and implications for diagnostics and regulation of veterinary vaccines. **Vaccine**, v. 31, n. 44, p. 5082–5087, 2013.
- VIDOR, C.; AWAD, M.; LYRAS, D. Antibiotic resistance, virulence factors and genetics of Clostridium sordellii. **Research in microbiology**, v. 166, n. 4, p. 368–374, 2015.
- WANG, S. et al. Novel chimeric protein vaccines against Clostridium difficile infection. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2440, 2018.
- Zhou, R., He, L., Zhang, J., Zhang, X., Li, Y., Zhan, X., Tao, L. Molecular basis of TMPRSS2 recognition by Paenoclostridium sordellii hemorrhagic toxin. **Nature Communications**, 15, 2024.