

AVALIAÇÃO DA INOCUIDADE DE PROTÓTIPOS VACINAIS RECOMBINANTES CONTRA *Clostridium septicum* EM CAMUNDONGOS BALB/C

MARTINA ALVES LEAL¹; CRISTIAN HENRIQUE SOTT²; WELINGTON MATEUS
PINTO DE MORAES³; PEDRO DALA NORA QUATRIN⁴; FLÁVIA ROCHA
MEDEIROS⁵; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – martinaalves0124@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – cristian.sott@ufpel.edu.br

³Universidade Federal de Pelotas – obiotecnologista@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – quatrinp@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – rochamedeirosflavia@gmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Clostridium* é amplamente conhecido pela sua capacidade de produzir toxinas em grandes quantidades, o que torna muitas doenças causadas por essas bactérias graves e frequentemente fatais. As bactérias desse gênero são organismos anaeróbicos, Gram positivos, e formadores de endósporos (CARTER et al., 2014; CRUZ-MORALES et al., 2019).

Entre as espécies do gênero *Clostridium*, o *C. septicum* se destaca por sua alta toxicidade vinculada a sua toxina alfa (TACS), a qual possui ação hemolítica, necrótica e letal (KENNEDY et al., 2005). A toxina alfa de *C. septicum* é fundamental na patogênese e está relacionada à ocorrência de gangrena gasosa (mionecrose) ou edema maligno em ruminantes e outras espécies animais (KNAPP et al., 2010). A gangrena gasosa se caracteriza pela necrose de tecidos moles, especialmente nos músculos, toxemia e morte súbita dos animais, causando perdas econômicas (LOBATO et al., 2008; GAZIOGLU et al., 2018).

No Brasil, diversos surtos de gangrena gasosa causada por *C. septicum* indicam falhas nas vacinas comerciais, reforçando sua ineficácia em atender aos pré-requisitos estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (LIMA et al., 2006; LOBATO et al., 2008). A vacinação com bacterinas-toxoides ou toxoides purificados é amplamente utilizada como medida de prevenção, estimulando o sistema imunológico a reconhecer e combater as toxinas responsáveis pela doença. No entanto, essas vacinas apresentam desafios significativos, que se iniciam em seu processo de produção. Atualmente, elas são obtidas por meio do cultivo anaeróbico de *C. septicum* em um meio complexo, envolvendo etapas laboriosas e riscos elevados aos operadores (ZARAGOZA et al., 2019). A complexidade e os riscos envolvidos no processo de fabricação têm impulsionado a busca por novas metodologias de imunização que possam superar essas barreiras, garantindo uma produção mais segura, eficiente e em conformidade com as normas regulatórias.

Considerando o panorama descrito, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de um protótipo vacinal utilizando a toxina TACS recombinante (rTACS) produzida em *Escherichia coli*. Essa abordagem tem como objetivo otimizar as características de produção da vacina, tornando-a mais eficiente e segura, além de incrementar a sua imunogenicidade. O foco inicial deste estudo foi avaliar a inocuidade de protótipos vacinais recombinantes contra *C. septicum* em camundongos Balb/c.

2. METODOLOGIA

2.1. Avaliação da expressão da rTACS em *Escherichia coli*

O vetor de expressão *pET28a* foi utilizado para expressar rTACS em *Escherichia coli* BL21 (DE3) STAR utilizando a metodologia descrita por Moreira Jr. et al., (2016). O plasmídeo contendo o gene *tacs* foi transformado na cepa de *E. coli* STAR por choque térmico (5 min no gelo, 1 min 42 °C e 5 min no gelo) e as células transformadas cultivadas por 1 h a 37 °C e 150 RPM em meio LB. O cultivo foi então transferido para 50 mL de LB suplementado com canamicina (100 µg/mL) e incubado overnight (37 °C, 150 RPM). O pré-inóculo foi transferido para um volume de 500 mL de LB com canamicina (100 µg/mL) e cultivado 28 °C e 150 RPM overnight. Alíquotas de 1 mL foram coletadas para avaliação da expressão e centrifugadas (7.000 x *g*, 2 min) para posteriores ensaios de SDS-PAGE e Western Blot.

2.2. Caracterização da solubilidade da rTACS

Para avaliar a solubilidade da rTACS, um volume de 200 mL do cultivo final (500 mL) foi destinado para a caracterização e posterior purificação. O cultivo foi centrifugado (7.000 *g*, 4 °C, 10 min) para separar o meio de cultura, e seu foi pellet ressuspenso em tampão wash (200 mM NaH₂PO₄, 0,5 M NaCl e 5 mM imidazole, pH 8,0), suplementado com lisozima (1 µL/mL) e incubado (1 h, 37 °C, 200 rpm) para posterior lise celular por sonicação (7 ciclos de 30s, amplitude 40) seguida de centrifugação (7.000 x *g*, a 4 °C, por 10 minutos), resultando no sobrenadante da lise que foi armazenado a 4°C para análise subsequente. O pellet resultante foi suspenso em tampão wash acrescido de 8 M ureia e mantido a 4 °C por 16 h sob agitação.

As proteínas obtidas na forma de sobrenadante da lise e sobrenadante da ureia foram avaliadas em ensaios de SDS-PAGE e *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-His6x (Sigma, USA).

2.3. Purificação da rTACS

Após determinada a localização das proteínas, o sobrenadante da lise foi utilizado para purificação após centrifugação (10.000 x *g* por 10 min) para diminuir a quantidade de debris celulares na amostra. A purificação foi realizada pela técnica de cromatografia de afinidade por níquel em coluna de Ni-Sepharose, utilizando o sistema automatizado ÄKTAprime® (GE Healthcare) e sua pureza avaliada por SDS-PAGE e *Western Blot*.

Amostras selecionadas para compor a formulação foram submetidas a diálise para a retirada do imidazol em tampão PBS durante um período de 12 h a 4 °C. A quantificação da rTACS na amostra foi realizada a partir do método BCA™ Protein Assay (Thermo Fisher) e os resultados obtidos foram utilizados no protótipo vacinal purificado não inativado.

2.4. Formulação do protótipo vacinal - bacterina

A formulação vacinal bacterina recombinante inativada foi produzida conforme descrito por Ferreira et al. (2019). O pellet obtido a partir da centrifugação do cultivo foi suspenso em solução salina 0,9% estéril com

formaldeído a 0,4% e incubado (37°C, 24h, 150 RPM). A confirmação da inativação foi verificada por meio da inoculação de 100 uL em ágar LB, seguido de incubação (37°C, 16 h). A formulação inativada foi então submetida a 3 lavagens com solução salina 0,9% estéril (7000 x g, 15 min, 4 C) e armazenada a 4°C, contendo 0,01% de timerosal.

A quantificação das proteínas recombinantes presentes na formulação vacinal foi feita por SDS-PAGE contendo a proteína (B) do kit BCA como curva padrão. A quantificação foi realizada por densitometria através do programa ImageJ. O cálculo de UFC (unidade formadora de colônias) foi feito com amostras obtidas do cultivo inicial através de plaqueamento em ágar LB de diluições seriadas.

2.5. Dose vacinal e vacinação

Ambas formulações vacinais foram compostas de 200 ug de antígeno recombinante diluído em PBS estéril e adsorvido em hidróxido de alumínio Al(OH)₃ (4 °C, 16 h) em uma concentração final de 1,5 % (m/v). Os testes de esterilidade das formulações para pesquisa de bactérias e fungos contaminantes foram então realizados antes da aplicação. O teste de inocuidade foi realizado com 3 grupos de 2 camundongos (n = 6) Balb/c (4 a 6 semanas de idade). Animais dos primeiros dois grupos foram testados com as formulações bacterina e purificada, enquanto o último grupo foi destinado ao controle apenas recebendo solução salina e hidróxido de alumínio. Cada animal recebeu uma dose de 500 µL da vacina e foram observados nas 12 h seguintes

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Solubilidade da proteína recombinante

Após os resultados obtidos por SDS-PAGE e Western Blot foi possível observar que a proteína recombinante estava igualmente distribuída no sobrenadante da lise e no sobrenadante da ureia (50%/50%) (**Figura 1**).

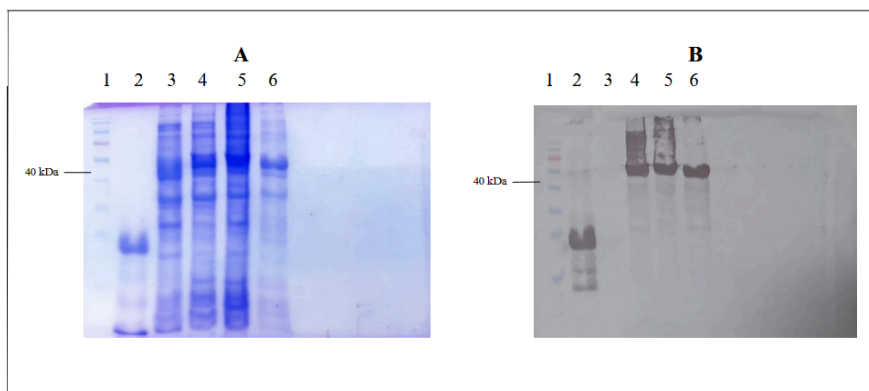


Figura 1 – SDS-PAGE e Western blot da expressão e solubilidade de rTACS, transformada em *E. coli* BL21 Star. (A) 1 – Marcador; 2 - Controle positivo; 3 - Controle negativo – extrato de *E. coli* Star; 4 - rTACS expressão; 5 - rTACS sobrenadante da lise; 6 - rTACS sobrenadante da ureia. (B) 1 – marcador; 2 – controle positivo; 3 – controle negativo – extrato de *E. coli* Star; 4 – rTACS expressão; 5 – rTACS sobrenadante da lise; 6 – rTACS sobrenadante da ureia

Teste de inocuidade

O grupo de animais que recebeu a formulação purificada da rTACS veio a óbito em um período de 5 h após aplicação, onde também foi observado sinais de dor aguda no grupo em que foi aplicada formulação bacterina, no entanto houve a sobrevivência desses animais e após 12 h da aplicação não demonstraram mais sinais de desconforto. Os animais do grupo controle que receberam apenas solução salina e hidróxido de alumínio não apresentaram nenhum desconforto após a aplicação e durante o período de testagem.

4. CONCLUSÕES

Neste estudo, os resultados destacam a necessidade de ajustes no protótipo vacinal bacterina inativada, com o objetivo de mitigar reações adversas observadas. Para isso, é fundamental investigar diferentes protocolos de inativação, incluindo a exposição ao formaldeído a 0,4% por períodos de 48 e 72 horas, além da avaliação de concentrações superiores (0,8%). A análise da resposta obtida com o protótipo vacinal purificado não inativado sustenta a significativa semelhança conformacional e estrutural da rTACS em relação à toxina nativa de *C. septicum*, o que justifica a toxicidade observada nas diferentes formulações. Embora essa toxicidade tenha ocasionado reações adversas nos grupos experimentais, ela também representa uma oportunidade promissora para o desenvolvimento de uma vacina que induz uma resposta eficaz. Assim, a implementação das modificações propostas na inativação poderá levar ao desenvolvimento de uma vacina que não só seja imunogênica, mas também segura no combate à clostridiose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARTER, G. P. et al. Regulation of toxin production in the pathogenic clostridia. **Molecular microbiology**, v. 91, n. 2, p. 221–231, 2014.
- CRUZ-MORALES, P. et al. Revisiting the evolution and taxonomy of Clostridia, a phylogenomic update. **Genome biology and evolution**, v. 11, n. 7, p. 2035–2044, 2019.
- KENNEDY, C. L. et al. The alpha-toxin of Clostridium septicum is essential for virulence: A-toxin of Clostridium septicum. **Molecular microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1357–1366, 2005.
- KNAPP, O. et al. Clostridium septicum alpha-toxin forms pores and induces rapid cell necrosis. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 55, n. 1, p. 61–72, 2010.
- GAZIOGLU, A. et al. Sudden death due to gas gangrene caused by Clostridium septicum in goats. **BMC veterinary research**, v. 14, n. 1, p. 406, 2018.
- R.A.; COSTA, J.N.; LOBATO, F. C. F. et al. AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE VACINAS CONTRA CLOSTRIDIUM SEPTICUM COMERCIALIZADAS NO BRASIL. Arquivos do Instituto Biológico, v. 75, n. 2, p. 225–228, 2008.
- ZARAGOZA, N. E. et al. Vaccine production to protect animals against pathogenic Clostridia. **Toxins**, v. 11, n. 9, p. 525, 2019.
- MOREIRA, C., Jr et al. Protective potential of recombinant non-purified botulinum neurotoxin serotypes C and D. **Anaerobe**, v. 40, p. 58–62, 2016.
- FERREIRA, M. R. A. et al. Inactivated recombinant Escherichia coli as a candidate vaccine against Clostridium perfringens alpha toxin in sheep. **Anaerobe**, v. 59, p. 163–166, 2019.