

AVALIAÇÃO DA ANTIGENICIDADE DOS DOMÍNIOS RECEPTORES DAS TOXINAS BOTULÍNICAS TIPOS C E D DE UMA QUIMERA RECOMBINANTE

**CUNHA, Carlos Eduardo Pouey da¹; GIL, Luciana Aquini Fernandes²;
MOREIRA, Gustavo¹; SANTOS, Diego Gil de los³; CONCEIÇÃO, Fabricio
Rochedo³**

¹Curso de graduação em Biotecnologia (Bacharelado), Universidade Federal de Pelotas; ²Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas; ³Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia.
cpouey@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

O botulismo é uma doença fatal caracterizada por paralisia muscular causada por neurotoxinas produzidas pela bactéria *Clostridium botulinum*, um bacilo anaeróbico formador de esporos encontrado no solo, água e matéria orgânica. Os esporos podem resistir por longos períodos nos mais diversos ambientes, germinando e proliferando em carcaças ou material vegetal em decomposição, nos quais produz neurotoxinas que, quando ingeridas, causam a doença, prejudicando a bovinocultura. As neurotoxinas botulínicas (BoNTs) são classificadas por suas diferenças antigênicas, embora possuam ações farmacológicas semelhantes (Simpson, 2004), e são divididas em sete sorotipos: A, B, C₁, D, E, F e G (Smith, 2009). No Brasil, os surtos de botulismo bovino são causados pelas BoNTs C e D (Dutra et al., 1993; Fernandes, 2001) e têm sido registrados nos últimos anos em extensas regiões do país acometendo, sobretudo, fêmeas em gestação ou lactação, com a estimativa de centenas de milhares de mortes (Döbereiner et al., 1998). Portanto, o botulismo é uma das principais causas de mortalidade de bovinos nas duas últimas décadas (Dutra et al., 2001).

Estruturalmente, as BoNTs são formadas por uma cadeia leve (CL) e uma pesada (CP), que formam três domínios característicos (Montecucco & Schiavo, 1995). O domínio catalítico, constituído pela CL, está ligado por uma ponte dissulfeto ao domínio de translocação, que constitui a porção N-terminal da CP. A porção C-terminal da CP, atóxica, constitui o domínio de ligação ao receptor neuronal (CPR), onde estão localizados os epitopos protetores das BoNTs (Clayton, 1995; Ravichandran, 2007). Caso não possa haver ligação entre o domínio CPR e o receptor neuronal, nenhum dano será causado.

A vacinação é a forma mais efetiva de controlar o botulismo bovino (Lee et al., 2007), sendo necessária a presença de anticorpos no momento da intoxicação. Contudo, apesar da eficiência, os toxóides botulínicos comerciais apresentam limitações no que diz respeito a sua produção industrial: *C. botulinum* produz baixos níveis de BoNTs; a produção em larga escala é laboriosa, onerosa e sua produtividade dificilmente previsível, além de altamente perigosa. Conseqüentemente, existe uma grande demanda para o desenvolvimento de vacinas recombinantes que minimizem os problemas associados à produção industrial de toxóides botulínicos. Para tanto, uma quimera recombinante composta pelos domínios CPR^C e CPR^D e pela subunidade B da toxina termolábel de *Escherichia coli* (LTB), um potente adjuvante da resposta imune humoral (Fischer et al., 2010), foi construída e expressa em *Escherichia coli* (Moreira et al., 2010).

Este trabalho tem por objetivo avaliar a antigenicidade dos domínios CPR^C e CPR^D presentes em uma quimera recombinante produzida para controle do botulismo bovino.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produção da quimera recombinante

A quimera recombinante usada neste estudo foi produzida, purificada e caracterizada conforme Cunha et al. (2011).

2.2 Avaliação da antigenicidade dos CPRs através de ELISA

A antigenicidade dos domínios rCPR presentes na quimera recombinante foi avaliada examinando seu reconhecimento por soros padrão anti-C e anti-D produzidos em ovinos (LANAGRO, MG), adsorvidos ou não com antígenos de *E. coli* BL21(DE3) Star, através de um ELISA indireto. Placas de poliestireno foram sensibilizadas com 200 ng por cavidade da quimera solubilizada em 0,4% (w/v) de N-lauroylsarcosine (NLS), em PBS e insolúvel (liofilizada e ressuspendida em PBS), diluídas em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6) (100 µL/cavidade) e incubadas *overnight* a 4 °C. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e bloqueadas com 5% (w/v) de leite em pó diluído em PBS-T. Todas as reações subseqüentes ocorreram por 1 hora a 37 °C, os reagentes foram utilizados a um volume de 100 µL/cavidade e as placas foram lavadas três vezes com PBS-T após todas as etapas de incubação. Após a etapa de bloqueio das placas, foram adicionadas, separadamente em triplicata, 0,25, 0,5 e 1 UI por cavidade dos soros padrão adsorvidos ou não. Após as lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo de coelho anti-anticorpo de ovino conjugado com peroxidase (1:4000). Após a remoção do excesso de conjugado, as reações foram reveladas utilizando uma solução contendo 0,4 mg/mL de ortofenilenodiamina (OPD) diluída em tampão citrato-fosfato pH 4,0 (0,2 M com 0,01% de H₂O₂) e as placas incubadas ao abrigo da luz por 15 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro para microplacas (Thermo Plate) com filtro de 450 nm. Cavidades sensibilizadas com 200 ng de rLTB ou 100 µL de extrato bruto de *E. coli* BL21 (DE3) Star (DO₆₀₀ = 1) foram usados como controles negativos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da antigenicidade dos CPRs através de ELISA

Os valores das absorbâncias foram submetidos à análise estatística usando o programa Statistix9. Foram utilizados ANOVA e teste de Tukey (p<0,05). A Tab. 1 apresenta as amostras que foram significativamente superiores aos controles utilizados.

Tabela 1: Amostras que apresentaram diferença estatística em relação aos controles negativos. 1 = 0,4% NLS; 2 = PBS; 3 = insolúvel. Ads = adsorvido.

Soro	0,25 UI	0,5 UI	1 UI
C	1, 2 e 3	1	1
C _{ads}	1 e 2	1	1, 2 e 3
D	0	1	1
D _{ads}	1	0	1 e 3

Considerando-se que as absorvâncias das cavidades sensibilizadas com a quimera recombinante foram significativamente maiores do que aquelas dos poços sensibilizados com antígenos de *E. coli*, nega-se a hipótese de que as reações nas cavidades com quimera tenham ocorrido devido a resquícios de proteínas de *E. coli* ainda presentes nas soluções avaliadas, sugerindo que os soros reconhecem os domínios CPR, o que é reforçado pelo fato dessas absorvâncias serem também significativamente diferentes daquelas apresentadas pela rLTB.

Conseqüentemente, acredita-se que anticorpos produzidos a partir da imunização com a quimera recombinante estejam aptos a reconhecer os domínios CPR das toxinas nativas, sendo assim uma molécula com potencial protetor para ser usada com vacina veterinária contra botulismo.

Quanto ao uso de soros adsorvidos, observa-se que, de acordo com a Tab. 1, uma forma a menos (insolúvel) da quimera foi significativamente diferente quando testada com 0,25 UI de soro padrão anti-C, ao passo que duas formas a mais (em PBS e insolúvel) foram reconhecidas pelo soro adsorvido na comparação dos testes com 1 UI. Já para o CPR^D, houve reconhecimento da quimera insolúvel, além da usada em 0,4% NLS, com 1 UI de soro padrão anti-D adsorvido.

Finalmente, a quimera solubilizada em 0,4% de NLS foi significativamente diferente em todos os casos, exceto nos testes com 0,25 UI de soro anti-D e 0,5 UI do soro anti-D adsorvido, sugerindo que essa forma tem o melhor potencial protetor em comparação com as demais.

4 CONCLUSÃO

Observando-se as diferenças estatísticas apresentadas pelas amostras em comparação com os controles negativos, é provável que todas tenham potencial para induzir proteção contra o botulismo bovino devido a sua antigenicidade, o que será futuramente testado em experimentação animal para avaliar a imunogenicidade e potencial como vacina veterinária, principalmente da quimera solubilizada em NLS, tendo em vista que foi significativamente diferente de ambos controles negativos em mais de 80% dos casos.

5 REFERÊNCIAS

CLAYTON, M.A.; CLAYTON, J.M.; BROWN, D.R.; et al. Protective vaccination with a recombinant fragment of *Clostridium botulinum* neurotoxin serotype A expressed from a synthetic gene in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 63:2738-2742, 1995.

CUNHA, C. E. P.; MOREIRA, G. M. S. G.; GIL, L.; CONCEICAO, F. R. SOLUBILIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA QUIMERA RECOMBINANTE COMPOSTA PELA LTB E DOMÍNIOS RECEPTORES DAS TOXINAS BOTULÍNICAS C E D. In: **IV Simpósio Sul de Imunologia e XXII Encontro Gaúcho de Imunologia**, 2011, Bento Gonçalves. **IV Simpósio Sul de Imunologia e XXII Encontro Gaúcho de Imunologia**, 2011

DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; LANGENEGGER, J.; et al. Epizootic botulism of cattle in Brazil. **Dtsch. Tierärztl. Wschr.** 99:188-190, 1998.

DUTRA, I.S.; WEISS, H.E.; WEISS, H.; et al. Diagnóstico de botulismo em bovinos no Brasil pela técnica de microfixação de complemento. **Pesq. Vet. Bras.** 13:83-86, 1993.

DUTRA, I.S.; DÖBEREINER, J.; ROSA, I.V. Surto de botulismo em bovinos no Brasil associados à ingestão de água contaminada. **Pesq. Vet. Bras.** 21:43-48, 2001.

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.

FISCHER, Geferson; CONCEIÇÃO, Fabricio R.; LEITE, Fábio P. L.; MORAES, Carina M.; FERREIRA, Lílian N.; VILELA, Camila O.; CAETANO, Clarissa F.; VARGAS, Gilberto D.; HÜBNER, Sílvia O.; VIDOR, Telmo; ROEHE, Paulo M. Recombinant Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit humoral adjuvant effect depends on dose and administration route. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 26, p. 489-495, 2010.

LEE, J.C.; HWANG, H.J.; SAKAGUCHI, Y.; et al. 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. **Microbiol. Immunol.** 51(4):445-55, 2007.

MONTECUCCO, C.; SCHIAVO, G. Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. **Q. Rev. Biophys.** 28:423-472, 1995.

MOREIRA, G. M. S. G.; CUNHA, C. E. P.; GIL, L.; CONCEICAO, F. R. EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF A RECOMBINANT CHIMERA FOR BOVINE BOTULISM CONTROL. In: **IMUNO 2010 XXXV CONGRESS OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR IMMUNOLOGY**, 2010, Porto Alegre. XXXV Congress of the Brazilian Society for Immunology, 2010.

RAVICHANDRAN, E.; AL-SALEEM, F.H.; ANCHARSKI, D.M.; et al. Trivalent vaccine against botulinum toxin serotypes A, B, and E that can be administered by the mucosal route. **Infect. Immun.** 75:3043-3054, 2007.

SIMPSON, L.L. Identification of the major steps in botulinum toxin action. **Annu. Vet. Pharmacol. Toxicol.** 44:67-93, 2004.

SMITH, L. A. Botulism and vaccines for its prevention. **Vaccine.** 27. D33-D39. 2009.