

AVALIAÇÃO DE VACINAS DE SUBUNIDADE RECOMBINANTE UTILIZANDO A rCP0369 DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* PARA LINFADENITE CASEOSA

ANDREA DE FÁTIMA S. REZENDE¹; KAREN SILVA LEAL²; ALEXANDRE ANTUNES BRUM²; ALEX PEREIRA RODRIGUES²; CARLOS GUILHERME ROSA REIS²; SIBELE BORSUK³

¹Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia – UFPel andreabiomedica@hotmail.com

²Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia – UFPel karensleal@hotmail.com

²Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia – UFPel alex.brum@bol.com.br

²Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia – UFPel alex.pereira.rodrigues@hotmail.com

³Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia – UFPel sibeleborsuk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A Linfadenite Caseosa (LC) é causada por *C. pseudotuberculosis*, uma bactéria gram-positiva, intracelular e anaeróbica facultativa, pleomórfica, que acomete principalmente os pequenos ruminantes (D'AFONSECA et al., 2010). É reconhecida como doença de importância mundial, em decorrência da alta prevalência e pelos prejuízos econômicos nos rebanhos (D'AFONSECA et al., 2008). Para evitar a disseminação da LC a melhor medida seria a imunização. Diversas linhagens de *C. pseudotuberculosis* foram sequenciadas fornecendo dados genômicos sobre este microrganismo (PINTO et al., 2012;). Com o resultado do sequenciamento foram identificados vários alvos, dentre eles pode-se citar o gene *cp1002_0369*, que codifica para uma proteína secretada sendo esta provavelmente uma fosfoesterase a qual é potencialmente imunogênica podendo com isso vir a ser utilizada no desenvolvimento de vacinas recombinantes (SANTOS et al., 2012). As formulações vacinais utilizando proteínas recombinantes necessitam de adjuvantes. Dentre alguns importantes adjuvantes utilizados com êxito destaca-se o hidróxido de alumínio, que é utilizado por várias décadas que induz principalmente resposta imune humoral (BAYLOR et al. 2002) e a xantana um polissacarídeo derivado de bactérias do gênero *Xanthomonas*, (SUTHERLAND et al., 1998; CHIOU et al., 2009).

Assim, o objetivo desse estudo foi desenvolver e avaliar vacinas de subunidade recombinante utilizando uma provável fosfoesterase de *C. pseudotuberculosis*, a rCP0369, associada aos adjuvantes xantana e hidróxido de alumínio, com a finalidade de avaliar o potencial imunoprotetor em modelo murino.

2. METODOLOGIA

2.2 Expressão da Proteína recombinante CP0369 em *E. coli*

O vetor contendo o gene *cp1002_0369* previamente construído (pAE/Cp1002_0369) foi utilizado para a transformação da cepa de expressão *E. coli* BL21 Star. A indução da expressão foi realizada pela adição de 1mM de IPTG ao meio de cultivo LB acrescido de 100µg/mL do antibiótico ampicilina. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de sepharose (HisTrap™), carregada com níquel. A detecção da expressão das proteínas, bem como sua pureza, foram observadas através de SDS-PAGE e por Western Blot utilizando o anticorpo monoclonal anti-6Xhistag (Sigma).

2.5 Imunização e desafio

Nos ensaios de imunização foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas de seis a oito semanas de idade, susceptíveis à infecção por *C. pseudotuberculosis*. Os

animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UFPEL. Os animais foram divididos em 5 grupos contendo 5 animais cada e foram realizadas 3 imunizações com intervalo de quinze dias por via intamuscular. Grupo controle positivo, a bacterina, foi obtida a partir da inativação de cultivo de *C. pseudotuberculosis* cepa Mic6 e os grupos controle negativo (Xantana e hidróxido de alumínio) receberam somente o adjuvante. Uma concentração de 50 µg da proteína rCP0369 associada aos adjuvantes xantana (0,3%/dose) e hidróxido de alumínio (15%/dose) foi utilizada.. As coletas de sangue foram realizadas nos dias 0, 15, 30 e 45 a partir da primeira imunização e estocado a -20 °C até a dosagem de anticorpos (IgG total) por ELISA. O desafio foi realizado 21 dias após a última dose da vacinação. Para isso, 10⁴ UFC da cepa Mic-6 de *C.pseudotuberculosis* foram inoculadas intraperitonealmente nos animais, os quais foram observados até 30 dias após o desafio.

2.6 Avaliação da resposta imune

A resposta imune humoral foi determinada por ELISA indireto. Placas de 96 cavidades de fundo chato (Maxisorp-Nunc) foram sensibilizadas com 0,5 µg/mL da proteína rCP0369 em tampão carbonato bicarbonato pH=9,8 e incubadas a 4 °C por 16 h. Após, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T (PBS 1X pH= 7.4; 0,1 % de Tween 20) e bloqueadas com 100 µL/cavidade de leite em pó desnatado 5 % diluído em por 1 h à 37 °C. Em seguida foram adicionados 100 µL/cavidade das amostras dos soros de camundongos, na diluição de 1:50, em duplicata. Após uma hora de incubação a 37 °C e três lavagens com PBS-T, foram adicionados 100 µL/cavidade do anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição de 1:6000. Após uma hora de incubação a 37 °C e três lavagens com PBS-T, 100 µL/cavidade de solução reveladora (200 moles ortofenilenodiamina [OPD, Sigma] diluído em 10 mL de tampão citrato-fosfato pH=7,6 e 10 µL de H₂O₂) foram adicionados. A absorbância foi medida a 450 nm utilizando um leitor de placas de ELISA (Mindray).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteína rCP0369 foi expressa na forma insolúvel por *E. coli* BL21 Star Ela foi solubilizada em uréia, e o rendimento obtido foi de 10,4 mg.L⁻¹. A identidade da proteína rCP0369 foi caracterizada mediante *Western blot* com anticorpo monoclonal (Mab) anti-6xHis (Figura 1).

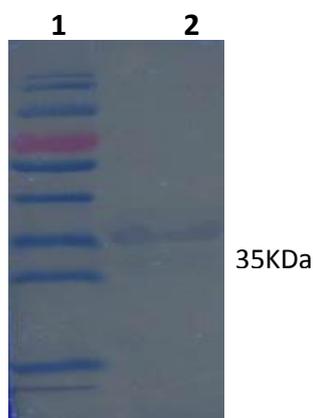


Figura 1: *Western Blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti- 6Xhis Tag (Sigma). (1): Marcador de peso molecular pré-corado (Invitrogen) (2): Proteína recombinante rCP0369 purificada (aproximadamente 35 kDa).

Através do ELISA, pode-se observar uma produção crescente dos níveis de IgG total do dia 0 ao dia 45 nos grupos B, C, H, I e J confirmando a imunogenicidade da proteína recombinante (Figura 2). Em um estudo anterior, camundongos vacinados com rHsp60 (heat shock protein) desenvolveram níveis significativos de IgG total em

relação ao grupo controle, o que se manteve durante todo o experimento, confirmando que essa proteína recombinante estimulou a produção de IgG total (PINHO et al., 2009), no entanto esses níveis de anticorpos não foram suficientes para induzirem proteção contra o desafio

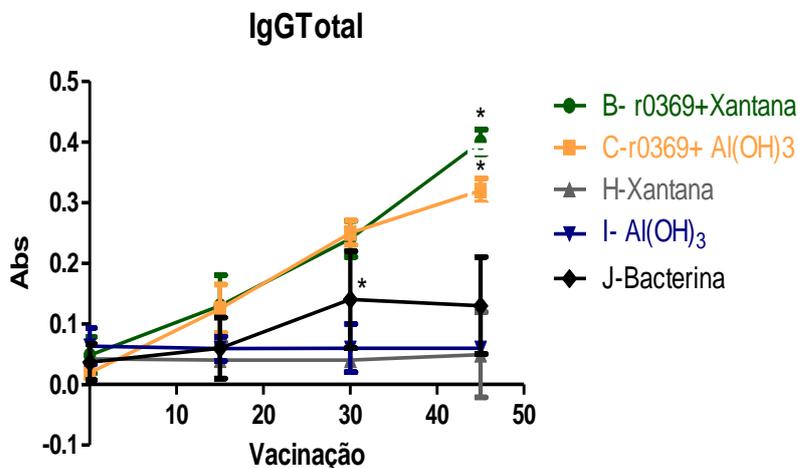


Figura 2: Determinação do nível de IgG total através de ELISA indireto utilizando a proteína recombinante rCP0369 nos grupos experimentais pós-imunização. As formulações vacinais contendo a proteína recombinante B (rCP0369+xantana) e C (r0369+ Al(OH)₃) demonstram um crescente nível de produção de IgG total em relação aos seus respectivos grupos controle negativo. * grupos onde houve diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre o grupo vacinal e o grupo controle.

Após o desafio com a cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis* pode-se observar que nenhuma das vacinas testadas conferiu de proteção significativa nos camundongos imunizados. No entanto uma sobrevida maior foi observada no grupo dos animais imunizados com a vacina recombinante composta pela proteína rCP0369 associada ao hidróxido de alumínio (grupo C). Os animais vacinados com a bactéria (grupo E) tiveram uma taxa de sobrevivência de 100%. Além disso, durante o experimento, principalmente nos dias que compreendem a primeira e a segunda doses vacinais foram observados alguns sintomas como febre, prostração e ferimento no local da vacinação. Tais reações observadas nos camundongos foram transitórias e permaneceram visíveis por uma a três semanas (Figura 3).

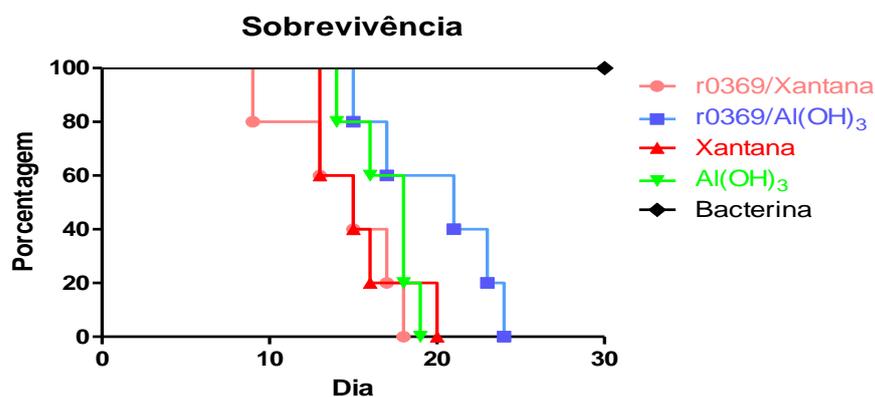


Figura 3: Curva de sobrevivência dos animais imunizados com as diferentes formulações vacinais após desafio com 10^4 UFC da cepa Mic6 de *C. pseudotuberculosis*.

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que uma das formulações vacinas em nosso estudo (rCP0369+ hidróxido de alumínio) aumentou a taxa de sobrevivência dos animais após desafio. Novas estratégias vacinas empregando a proteína CP0369 serão avaliadas para aumentar a eficácia da vacina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAYLOR, N.W.; EGAN, W.; RICHMAN, P. Aluminum salts in vaccines--US perspective. **Vaccine**. **3**: 18-23, 2002.

CHIOU, C.J.; TSENG, L.P.; DENG, M.C.; JIANG, P.R.; TASI, S.L.; CHUNG, T.W.; HUANG, Y.Y.; LIU, D. Mucoadhesive liposomes for intranasal immunization with an avian influenza virus vaccine in chickens. **Biomaterials**. **30**: 5862-5868, 2009.

D'AFONSECA, V.; MORAES, P. M.; DORELLA, F. A.; PACHECO, L. G.; MEYER, R.; PORTELA, R. W.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. **Genet.Mol.Res.**, v.7, n.1, p.252-260, 2008.

D'AFONSECA, V.; PROSDOCIMI, F.; DORELLA, F. A.; PACHECO, L. G.; MORAES, P. M.; PENA, I.; ORTEGA, J. M.; TEIXEIRA, S.; OLIVEIRA, S. C.; COSER, E. M.; OLIVEIRA, L. M.; CORREA DE, O. G.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Survey of genome organization and gene content of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Microbiol.Res.**, v.165, n.4, p.312-320, 2010.

PINTO, A. C.; RAMOS, R. T.; SILVA, W. M.; ROCHA, F. S.; BARBOSA, S.; MIYOSHI, A.; SCHNEIDER, M. P.; SILVA, A.; AZEVEDO, V. The core stimulon of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain 1002 identified using ab initio methodologies. **Integr.Biol.(Camb.)**, v.4, n.7, p.789-794, 2012.

SANTOS, A. R.; CARNEIRO, A.; GALA-GARCIA, A.; PINTO, A.; BARH, D.; BARBOSA, E.; ABURJAILE, F.; DORELLA, F.; ROCHA, F.; GUIMARAES, L.; ZURITA-TURK, M.; RAMOS, R.; ALMEIDA, S.; SOARES, S.; PEREIRA, U.; ABREU, V. C.; SILVA, A.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. The *Corynebacterium pseudotuberculosis* in silico predicted pan-exoproteome. **BMC.Genomics**, v.13 Suppl 5, p.S6, 2012.

SUTHERLAND, I.W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends Biotechnol.** **16**: 41-46, 1998.