

AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO CONFERIDA POR VACINAS RECOMBINANTES DE SUBUNIDADE PARA O CONTROLE DE LINFADENITE CASEOSA

ALEXANDRE BRUM¹; ANDREA REZENDE; ALEX RODRIGUES; HENRIQUE ANGELO; CARLOS GUILHERME ROSA REIS²; SIBELE BORSUK³

¹Universidade Federal de Pelotas – alex.brum@bol.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – CDTec - LPDI

³Universidade federal de Pelotas – sibeleborsuk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A Linfadenite Caseosa (LC) é uma doença crônica, infectocontagiosa, conhecida também como “Mal do Caroço” ou “Falsa Tuberculose”. *Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente etiológico desta doença que se manifesta de diferentes formas. Em ovinos e caprinos é conhecida como linfadenite caseosa, nos equinos como linfangite ulcerativa e/ou abscesso peitoral do cavalo e abscessos cutâneos em bovinos (Baird & Fontaine, 2007; Peel et al., 1997; Mills et al., 1997).

A LC tem sido responsável por perdas econômicas significativas na ovinocaprinocultura em diversos países do mundo (Sting et al., 1998; Pepin et al., 1999; Paule et al., 2003) incluindo o Brasil, principalmente nas regiões norte, sul e sudeste (Correa e Correa, 1992). Essas perdas estão relacionadas à redução no ganho de peso e na produção leiteira, bem como, inviabilização a comercialização da pele e da carne (Brown et al., 1987).

O sequenciamento do genoma de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, possibilitou a identificação de novos alvos para uso em vacinas recombinantes e de DNA (Silva, et al., 2011). Vários estudos demonstraram imunoproteção contra diversas doenças infecciosas utilizando vacinas recombinantes (Silva et al., 2007; Simionatto et al., 2010).

O sequenciamento do genoma de *C. pseudotuberculosis*, agente causador da linfadenite caseosa, permitiu identificar alvos importantes como, por exemplo, os genes Cp1002_1802, e Cp1002_1957. Esses genes codificam para proteínas potencialmente antigênicas e tem sua estrutura conservada em várias linhagens de *C. pseudotuberculosis* (D’Afonseca, et al., 2008). Análises complementares *in silico* no PDB (Protein Data Bank) mostraram que o gene CP1002_1957, codifica para uma provável Trehalose corynomycolyl transferase B e o gene CP1002_1802 para uma provável lipase. Essas sequencias tem potencial de serem antigênicas e podem ser testadas como vacinas recombinantes de subunidade, que requererem a administração de um adjuvante. Adjuvantes são substâncias químicas que incrementam a resposta imune associado aos antígenos e acarretam a redução da necessidade de antígenos e do número de imunizações (Vogel, 1998). Potentes adjuvantes estão correlacionados com elevados níveis de toxicidade. Minimizar essa toxicidade é o desafio para pesquisa de novos adjuvantes. Um bom adjuvante deve ter como características principais a estabilidade da molécula, baixo custo, ser biodegradável, assimilável, inerte e principalmente conferir um “booster” imunológico.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de vacinas de subunidade recombinantes associados aos adjuvantes, hidróxido de alumínio e

adjuvante de Freund mediante desafio com a cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*.

2. METODOLOGIA

2.1. Expressão e purificação das proteínas recombinantes CP1802 e CP1957

Os plasmídeos pAE/1957 e pAE/1802, previamente construídos foram utilizados para a expressão das proteínas recombinantes. Para isso, estes foram utilizados para transformação da cepa de expressão *E. coli* BL21 Star por choque térmico. Após indução da expressão de deu pela adição de 1mM de IPTG ao meio de cultivo LB acrescido do antibiótico ampicilina a 100 µg/mL. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade ao níquel, e a pureza das proteínas foi verificada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%.

2. Imunização de camundongos e desafio

As proteínas recombinantes purificadas (CP1802 e Cp1957) foram utilizadas na inoculação de camundongos BALB/c fêmeas com 6 a 8 semanas de idade, utilizando-se adjuvante de Freund incompleto na proporção v/v e para a utilização de hidróxido de alumínio 15% v/v. Foram utilizados 7 grupos de 5 animais que foram inoculados com 50µg/dose/animal das proteínas associadas aos adjuvantes em 3 doses com intervalo de 15 dias cada por via intramuscular (I.M.) conforme segue: grupo A- rCp1002_1957 e 15 % do volume de hidróxido de alumínio, grupo B, rCp1002_1957 e adjuvante incompleto de Freund, grupo C, rCp1002_1802 e hidróxido de alumínio, grupo D, rCp1002_1802 e adjuvante incompleto de Freund, grupo E, solução salina e hidróxido de alumínio (controle negativo); grupo F, adjuvante incompleto de Freund (controle negativo) grupo G, bacterina composta por cultivo inativado por calor de *C. pseudotuberculosis* cepa 1002 (controle positivo). O experimento de desafio foi realizado 21 dias após a última dose utilizando-se 10⁴UFC da cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis* Mic6. A sobrevivência dos animais foi avaliada por 30 dias após desafio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As proteínas foram expressas como insolúveis por *E. coli* BL21 Star. Na figura 1 pode-se observar as proteínas com os tamanhos de aproximadamente 34 kDa com cauda de histidina para CP1957 e 38 kDa com cauda de histidina para a CP1802.

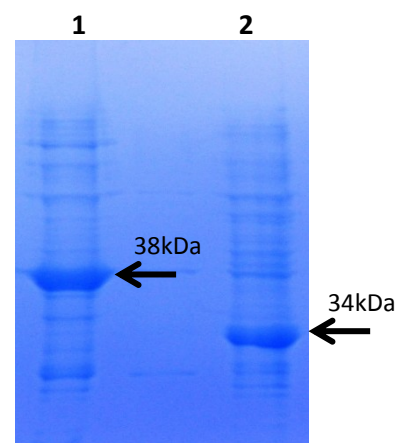


Figura 1: SDS-PAGE 12% mostrando a expressão em 1) da proteína recombinante Cp1802 em *E. coli* BL21 Star e em 2) da proteína recombinante Cp1957 clone 1 em *E. coli* BL21 Star. S – Fração Solúvel. IN- Fração Insolúvel.

Após o desafio dos animais vacinados com a cepa virulenta pode-se observar que formulação vacinal que utiliza a proteína rCP1957 associada ao hidróxido de alumínio (grupo A) promoveu uma proteção de 20%, enquanto o controle positivo composto pela bacterina proporcionou 100% de proteção. Os grupos controles negativos (grupo E e F), bem como os demais grupos vacinais (Grupo B, C, D) não conferiram proteção. Todos os animais dos grupos controles negativos vieram a óbito do dia 5 ao dia 15 pós-desafio. Uma vacina utilizando a proteína recombinante HSP60, não conferiu proteção após desafio (Pinho et.al., 2009), a vacina desenvolvida em nosso estudo apresentou algum nível de proteção embora não significativo.

A taxa de sobrevivência conferida pela proteína rCP1957 associada ao hidróxido de alumínio ainda é pouco satisfatória, indicando a necessidade de associação destas proteínas, ou outras abordagens vacinais. No entanto, novos testes serão realizados com estas proteínas coadministradas e associadas a cepas mutantes de *C. pseudotuberculosis* na busca de uma proteção mais efetiva.

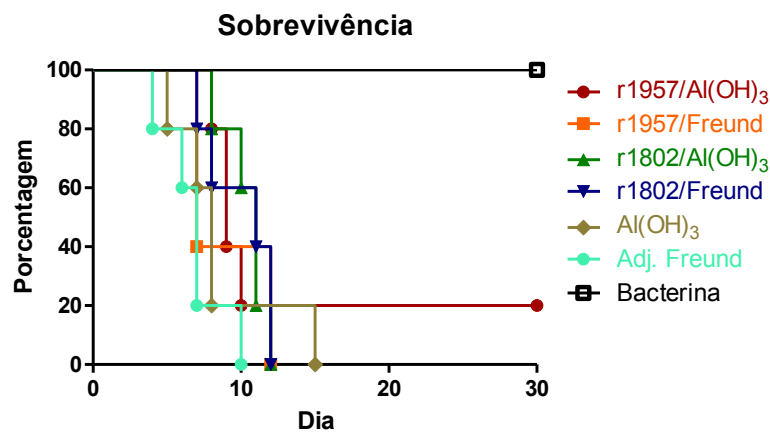


Figura 2: Curva de sobrevivência dos animais imunizados com as diferentes formulações vacinais após desafio com 10⁴ UFC da cepa Mic6 de *C. pseudotuberculosis*.

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que após o desafio dos animais vacinados a formulação vacinal que utiliza a proteína rCP1957 associada ao hidróxido de alumínio (grupo A) promoveu uma proteção parcial de 20%. No entanto esse ainda é um índice baixo de sobrevivência, novas estratégias vacinais empregando a proteína rCP1957 serão avaliadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAIRD, G.J. and FONTAINE, M.C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **J. Comp Pathol.** 137, 179-210. 2007.

BROWN, C.C., OLANDER, H.J., ALVES, F.C. Synergistic hemolysis-inhibition titers associated with caseous lymphadenitis in a slaughterhouse survey of goats and sheep in northeastern Brazil. **Can. J.Vet. Res.** 51, 46-49. 1987.

- CORREA, W.N., CORREA, C.N.N., Linfadenite caseosa, In: Correa, W.N., Correa, C.N.N. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos*. p.147-149. 1992.
- D'AFONSECA, V., MORAES, P.M., DORELLA, F.A., PACHECO, L.G., MEYER, R., PORTELA, R.W., MIYOSHI, A. and AZEVEDO, V. A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. *Genet. Mol. Res.* 7, 252-260. 2008.
- MILLS, A.E., MITCHELL, R.D., LIM, E.K., *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a cause of human necrotising granulomatous lymphadenitis. *Pathology*. 29, 231–233. 1997.
- PAULE, B.J., AZEVEDO, V., REGIS, L.F., CARMINATI, R., BAHIA, C.R., VALE, V.L., MOURA-COSTA, L.F., FREIRE, S.M., NASCIMENTO, I., SCHAER, R., GOES, A.M. and MEYER, R. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon-gamma production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 96, 129-139. 2003.
- PEEL, M.M., PALMER, G.G., STACPOOLE, A.M., KERR, T.G. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. *Clin. Infect. Dis.* 2, 185–191. 1997.
- PEPIN, M., SANCHIS, R., PATON, M. La lymphadenite caseuse des ovins et des caprins. *Point Vet.* 30, 33–40. 1999.
- SILVA, A., SCHNEIDER, M.P., CERDEIRA, L., BARBOSA, M.S., RAMOS, R.T., CARNEIRO, A.R., SANTOS, R., LIMA, M., D'AFONSECA, V., ALMEIDA, S.S., Santos, A.R., Soares, S.C., PINTO, A.C., Ali, A., DORELLA, F.A., ROCHA, F., DE ABREU, V.A., TROST, E., TAUSH, A., SHPIGEL, N., MIYOSHI, A. and AZEVEDO, V. Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* I19, a strain isolated from a cow in Israel with bovine mastitis. *J. Bacteriol.* 193, 323-324. 2011.
- SILVA, E.F., MEDEIROS, M.A., MCBRIDE, A.J.A., MATSUNAGA, J., ESTEVES, G. S., RAMOS, J.G.R., SANTOS, C.S., CRODA, J., HOMMA, A., DELLAGOSTIN, O.A., HAAKE, D.A., REIS, M.G., KO, A.I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. *Vaccine (Guildford)* v. 25 p. 6277-6286. 2007.
- SIMIONATTO, S., MACHIORO, S.B., HARTWIG, D., GALLI, V., CARLESSI, R.M., MUNARI, F.M., LAURINO, J.P., CONCEIÇÃO, F. R., DELLAGOSTIN, O. A., Cloning and purification of recombinant proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *E. coli* systems. *Protein Express Purif.* v. 69, 132-136. 2010.
- STING, R., STENG, G. and SPENGLER, D. Serological studies on *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats using enzyme-linked immunosorbent assay. *Zentralbl. Veterinarmed.* B 45, 209-216. 1998.
- VOGEL, F. R. Adjuvants in perspective. In: Brown F, Haaheim LR, editors. *Modulation of the immune response to vaccine antigens*. Dev. Biol. Stand. Karger: Basel; p. 8 - 241. 1998.