

AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO INDUZIDA POR UMA VACINA DE DNA CONTENDO O GENE *cp1957* DE *C. pseudotuberculosis*

**REIS, Carlos G. R.¹; BRUM, Alexandre²; REZENDE, Andréa F.S.²; LEAL, Karen²;
 FELLICETI, Cristiane²; BORSUK, Sibebe³.**

¹Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia, UFPel - carlosgreis@gmail.com

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

²Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia, UFPel - andreabiomedica@hotmail.com

²Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia, UFPel - karenleal@hotmail.com

²PPG Parasitologia, UFPel - crispdias@yahoo.com.br

³Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia, UFPel - sibebeborsuk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A Linfadenite Caseosa (LC) é uma doença crônica e infectocontagiosa, que acomete pequenos ruminantes como ovinos e caprinos. É reconhecida como doença de importância mundial em decorrência da alta prevalência, levando a sérias perdas econômicas para as atividades de ovinocaprinocultura (D'AFONSECA et al., 2008). No Brasil, sua prevalência é em torno de 30%. Uma bactéria gram-positiva não esporulada, intracelular facultativa, pleomórfica, anaeróbia facultativa e parasita de macrófagos, denominada *Corynebacterium pseudotuberculosis*, é seu agente etiológico (ANDERSON et al., 2005).

A LC caracteriza-se por lesões na forma de abscessos em linfonodos superficiais e viscerais (SEYFFERT et al., 2010), que levam à depreciação da pele e lã, redução na produção de carne e leite e morte ocasional (PAULE et al., 2003). A transmissão ocorre principalmente pela contaminação da água, alimentos e feridas por descargas purulentas a partir da fistulação dos abscessos de animais doentes (STING et al. 1998). O tratamento com antibióticos pode não ser viável devido ao alto custo, sendo que muitas vezes não é capaz de atravessar a cápsula que envolve o abscesso (ALVES, 1997).

As vacinas convencionais atualmente disponíveis não se mostram suficientemente viáveis e/ou eficientes. Vacina de DNA contra LC já foi testada, porém com resultado pouco satisfatório, induzindo resposta imune, mas sem conferir proteção efetiva contra infecção pela bactéria (COSTA et al., 2011). Com o resultado do sequenciamento e da análise proteômica foram identificados vários alvos, dentre eles o gene *cp1002_1957* que codifica uma proteína transferase, potencialmente antigênica (SANTOS et al., 2012). Assim, este estudo teve como objetivo desenvolver vacinas recombinantes de DNA utilizando o gene *cp1002_1957* de *C. pseudotuberculosis* e avaliar seu potencial imunoprotetor.

2. METODOLOGIA

Os clones recombinantes (pAE/1957) previamente construídos foram utilizados para transformar células de *E. coli* BL21 Star para expressão da proteína rCP1957. A indução se deu por adição de 1 mM de IPTG ao meio de cultivo. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de sefarose carregada com níquel. A pureza foi determinada através de SDS-PAGE 12%, e a concentração através de kit BCA (Pierce).

Para a construção da vacina de DNA, o gene *cp1002_1957* amplificado por PCR foi clonado no vetor pTARGET utilizando o kit de clonagem pTARGET™

Mammalian Expression Vector System (Promega, USA) segundo instruções do fabricante. O plasmídeo pTARGET/1957 foi utilizado para transfecção de células Chinese Hamster Ovary (CHO), a verificação da expressão da proteína CP1957 foi avaliada por Imunofluorescência Indireta utilizando soros policlonais de camundongos imunizados com a proteína recombinante CP1967.

Para a imunização, foram utilizados camundongos BALB/c machos de 6-8 semanas de idade fornecidos pelo Biotério Central da UFPel. Os animais foram divididos em 4 grupos de 5 animais conforme acordo com a tabela 1. Foram realizadas 3 imunizações com intervalo de 15 dias por via intramuscular. O desafio foi realizado 21 dias após a última dose vacinal com a inoculação de 10^4 UFC da cepa Mic6 de *C. pseudotuberculosis*. Os animais foram observados diariamente até o dia 30 pós-desafio. Além dos grupos vacinais utilizamos controle negativo (pTARGET) e um controle positivo composto por uma bactéria produzida por inativação por calor da cepa de *C. pseudotuberculosis* Mic6.

Grupo	Vacina	Dose
A	pTARGET/1957	50 µg/animal
B	Prime-boost (pTARGET/1957 + rCP1957)	50 µg/animal
C	pTARGET	50 µg/animal
D	Bacterina	10^6 UFC/animal

Tabela 1: Grupos vacinais e quantidade das vacinas utilizadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 apresenta a transfecção de células CHO com DNA do vetor pTARGET/1957. Pode-se observar fluorescência em algumas células indicando que a proteína CP1957 foi expressa *in vitro*, demonstrando que a vacina de DNA é viável para expressão em células eucarióticas. Esta condição é essencial a fim de que haja ação imunoprotetora, e deve ser verificada para que se prossiga à avaliação da vacina de DNA *in vivo*.



Figura 1: Avaliação da transfecção de células CHO por Imunofluorescência Indireta. A- Transfecção com DNA do vetor pTARGET (controle negativo). B- Transfecção com DNA do vetor pTARGET/1957.

Após o desafio com a cepa virulenta Mic6, os animais do grupo C - pTARGET (controle negativo) foram todos a óbito até o dia 10º dia pós-desafio, demonstrando o tempo necessário para que ocorra a morte pela doença após inoculação apenas

do pTARGET. O grupo D - bacterina (controle positivo) apresentou sobrevivência de 100%. A formulação vacinal contendo a vacina de DNA com um reforço com a proteína rCP1957 (grupo B) aumentou a taxa de sobrevivência em 3 dias. A vacina de DNA pTARGET/1957 (grupo A) proporcionou uma taxa de sobrevivência de 20% 30 dias após o desafio. Este resultado não apresenta valor significativo estatisticamente para ser considerado, mas pode evidenciar potencial imunoprotetor da vacina testada. Resultados similares a este já foram obtidos em outros estudos com vacinas recombinantes. (PINHO et al. 2009). Um deles utilizou a proteína Hsp60 de *C. pseudotuberculosis*. Ela foi utilizada na sua forma recombinante como vacina associada ao adjuvante hidróxido de alumínio em camundongos, mas não conferiu proteção contra o desafio. Também Costa et al. (2011) utilizou o gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* em vacina de DNA em experimento com camundongos, constatando indução de resposta imune celular, porém falha na proteção contra desafio. Isto leva a crer que, mesmo havendo indução da imunidade, esta pode não ter sido suficiente para proteger contra a doença. Uma alternativa para este problema seria utilizar esta vacina de DNA em combinação com outras proteínas recombinantes potencialmente antigênicas, de forma a se obter a imunoproteção necessária.

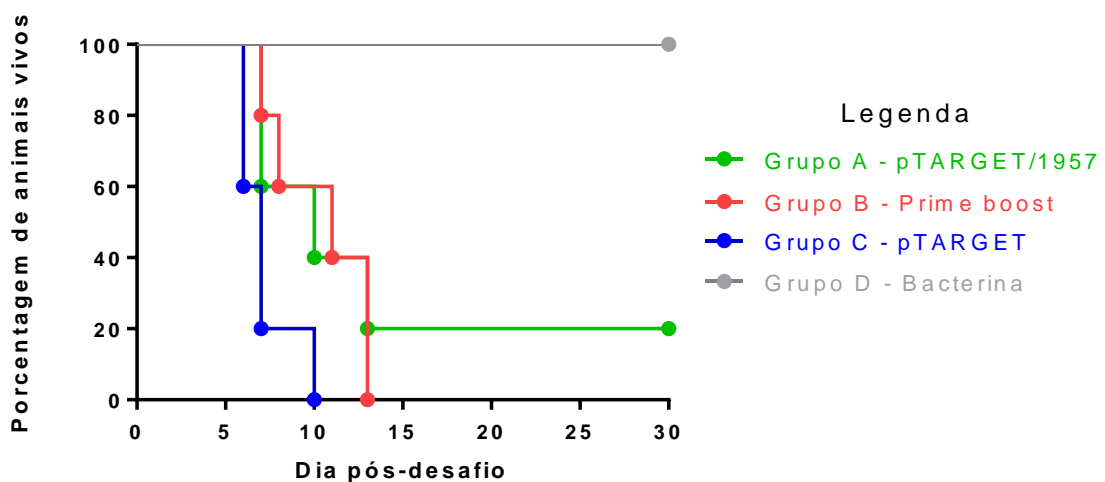


Figura 2: Sobrevivência dos grupos vacinais ao desafio.

4. CONCLUSÕES

Um provável potencial imunoprotetor foi obtido em uma formulação vacinal composta pela vacina de DNA (pTARGET/1957), que foi a única capaz de manter sobrevivência até o fim do experimento. Este resultado é positivo, apesar de não representativo estatisticamente, pois revela possível proteção contra LC e fonte promissora de trabalhos posteriores. Experimentos adicionais e novas estratégias utilizando a vacina de DNA pTARGET/1957 serão realizados para que o resultado seja confirmado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. Linfadenite caseosa – Recomendações e medidas profiláticas. **Embrapa** – Comunicado Técnico, n. 33, p. 1-4, 1997.

ANDERSON, D.E.; RINGS, D.M.; PUGH, D.G. Enfermidades do sistema tegumentar. In: PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2005.

COSTA M.P.; McCULLOCH, J.A.; ALMEIDA, S.S.; DORELLA, F.A.; FONSECA, C.T.; OLIVEIRA, D.M.; TEIXEIRA, M.F.; LASKOWSKA, E.; LIPINSKA, B.; MEYER, R.; PORTELA, R.W.; OLIVEIRA, S.C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; Molecular characterization of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* hsp60-hsp10 operon, and evaluation of the immune response and protective efficacy induced by hsp60 DNA vaccination in mice. **BMC Res Notes**. V.20; nº4, p.243, 2011.

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.**, online, 7, 252-260, 2008.

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.

PINHO, J.M.R., DORELLA, F., COELHO, K.S., FONSECA, C.T., CARDOSO, F.S., MEYER, R., PORTELA, R.W., OLIVEIRA, S.C., MIYOSHI, A. and AZEVEDO, V. Immunization with Recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis* Heat-Shock Protein (Hsp)-60 is Able to Induce an Immune Response in Mice, But Fails to Confer Protection Against Infection. **The Open Veterinary Science Journal** 3, 22-27, 2009.

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. and AZEVEDO, V.. The *Corynebacterium pseudotuberculosis* in silico predicted pan-exoproteome. **BMC. Genomics** 13 Suppl 5, S6, 2012.

SEYFFERT, N., GUIMARÃES, A.S., PACHECO, L.G.C., PORTELA, R.W., BASTOS, B.L., DORELLA, F.A., HEINEMANN, M.B., LAGE, A.P., GOUVEIA, A.M.G., MEYER, R., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Res Vet Sci.** 81, 50-55, 2010.

STING, R.; STENG, G.; SPENGLER, D. Serological studies on *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats using enzyme-linked immunosorbent assay. **Zentralbl.Veterinarmed. B**, v.45, n.4, p.209-216, 1998.