

DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA RECOMBINANTE VETORIZADA EXPRESSANDO A PROTEÍNA CP40 DE *C. PSEUDOTUBERCULOSIS*

KAREN SILVA LEAL¹; CRISTIANE PIRES DIAS FELICETTI²; ANDRÉA SILVA REZENDE²; SIBELE BORSUK³

¹Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia, UFPel- karensleal@hotmail.com

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

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

1. INTRODUÇÃO

A Linfadenite caseosa (LC), é uma doença infecciosa crônica causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Esta doença é caracterizada por formar abscessos crônicos, aumento dos linfonodos superficiais e viscerais. A incapacidade de diagnosticar a infecção resulta em uma alta transmissão da doença entre os animais (HOELZLE et al. 2013). A disseminação da doença se dá também pela ineficácia dos antibióticos por não conseguirem acessar a espessa cápsula de tecido conectivo que reveste os abscessos típicos e o denso conteúdo caseoso presente no interior dos piogranulomas (DORELLA et al. 2009;)

A LC acomete principalmente pequenos ruminantes como cabras e ovelhas, causando grandes perdas econômicas, como menor produção de lã, animais apresentando baixo peso, preços reduzidos no matadouro, condenação da carcaça, desvalorização da pele devido a cicatrizes advindas dos abscessos e ocasionalmente morte dos animais acometidos (DORELLA et al. 2009; HOELZLE et al. 2013). Em alguns estados brasileiros a incidência da doença pode chegar a 70% em rebanhos de ovinos e 80% em caprinos (GUIMARÃES et al., 2011).

Uma abordagem que pode conferir níveis de proteção satisfatórios é a utilização de vacinas recombinantes vetorizadas, dentre os diferentes tipos pode-se citar o *Mycobacterium bovis* BCG, que já se mostrou eficiente em termos de proteção contra várias enfermidades (COSTA et al. 2014; DENG et al. 2013; RIZZI et al. 2012). O BCG é um atrativo vetor vivo para o desenvolvimento de vacinas recombinantes e multivalentes, pois apresenta propriedades adjuvantes, não é afetado pelos anticorpos maternos, uma única dose confere uma longa resposta imune, é estável e seguro, pode ser administrado oralmente e tem um baixo custo de produção quando comparado a outras vacinas vivas (COSTA et al. 2014); Além disso, o *M. bovis* BCG é mundialmente administrado como vacina para a tuberculose (KAUFMANN et al. 2012).

Um alvo de grande potencial é a serina-protease de 40 kDa (CP40) (WILSON et al. 1995) produzida pelo *C. pseudotuberculosis*, a qual conferiu proteção significativa em ovinos vacinados com a proteína CP40 nativa purificada (WALKER et al. 1994)

Assim, este trabalho propõe o desenvolvimento e avaliação de *M. bovis* BCG Pasteur expressando a proteína CP40 de *C. pseudotuberculosis* com a finalidade de avaliar o potencial imunológico e imunoprotetor.

2. METODOLOGIA

Cepa e cultivo. O *M. bovis* BCG Pasteur (cedido por Dr. Johnjoe McFadden – University of Surrey) foi cultivada em meio 7H9 Middlebrook (Difco)

suplementado com 10% de OADC (Oleic Acid Albumin Dextrose Complex), 0,2% de Glicerol e 0,05% de Tween 80 ou em meio sólido 7H10 (Difco), contendo 10% de OADC e 0,2% de Glicerol, e quando necessário foi utilizado o antibiótico canamicina (50mg/mL).

Construção de *M. bovis* BCG recombinante expressando CP40. A sequência do gene *cp40* foi amplificada através da técnica de PCR utilizando DNA genômico de *C. pseudotuberculosis* cepa 1002, para a clonagem nos vetores de expressão em BCG Pasteur (pUS2000 e pUS977) para a obtenção da cepa recombinante. Os *primers* foram desenhados a partir da sequência depositada no GenBank, com o auxílio do programa *Vector NTI 10.0* (Invitrogen)

Avaliação da expressão da proteína CP40 em *M. bovis* BCG. A expressão da proteína recombinante foi demonstrada utilizando a técnica de *Western blot*. Dez mililitros da cultura recombinante foram centrifugados, as proteínas destas frações foram separadas em gel de SDS-PAGE 12% e eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose e a expressão da proteína CP40 avaliada pela técnica de *Western blot* e utilizando o soro policlonal anti-CP40 produzido em camundongos na diluição 1:80 em PBS-T 1X por 1h. Após foi adicionado o anti-mouse conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição 1:4000 em PBS-T 1X por 1h. A reação foi revelada por quimioluminescência pela adição do substrato para a peroxidase.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Clonagem do gene *cp40* em vetores de expressão em *M. bovis* BCG Pasteur

Um fragmento de 1.131 pb referente ao gene *cp40* foi amplificado no tamanho esperado (Figura 1). Este foi ligado aos vetores de expressão em *M. bovis* BCG, pUS2000 e pUS977, na figura 2 pode-se observar os clones recombinantes após a caracterização por digestão enzimática com as enzimas de restrição *XbaI* e *HindIII*.

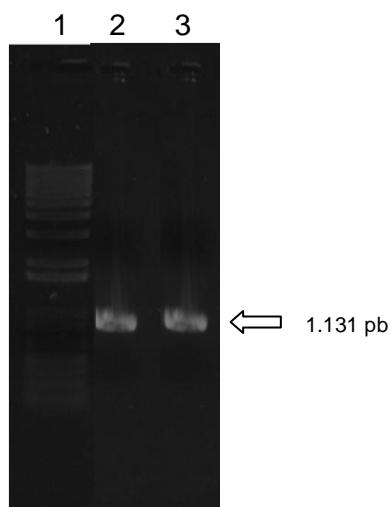


Figura 1: Eletroforese em Gel de agarose 1%. 1- Marcador 1kb (Invitrogen); 2 e 3- gene *cp40*;

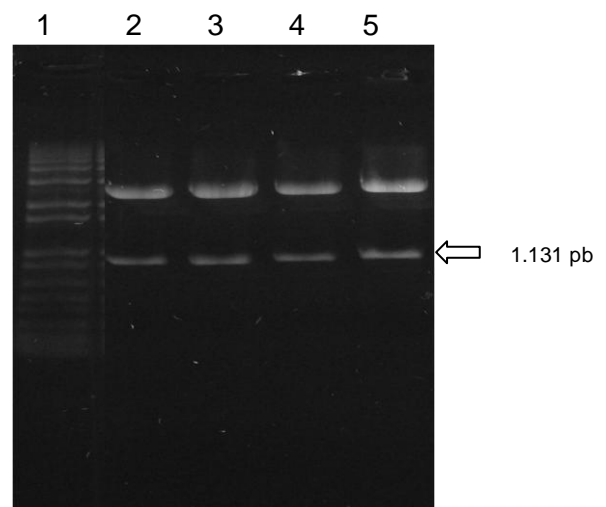


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose 1%, demonstrando a caracterização dos clones recombinantes. 1- Marcador 1kb (Invitrogen); 2- pUS977/*cp40*; 3- pUS977/*cp40*; 4- pUS2000/*cp40*; 5- pUS2000/*cp40*;

Expressão da proteína CP40 em *M. bovis* BCG Pasteur

Muitos sistemas de expressão de antígenos heterólogos em BCG já foram desenvolvidos a fim de permitir a construção de BCG recombinantes (rBCG) (TRICCAS 2010). Além da superexpressão de antígenos heterólogos, outras modificações genéticas podem aprimorar as propriedades imunogênicas e adjuvantes do BCG, permitindo a construção de um vetor mais eficiente que o parental (SUN et al. 2009).

Na figura 3, podemos observar a expressão da proteína recombinante CP40 na cepa *M. bovis* BCG Pasteur, no tamanho esperado de 40 KDa, quando comparado ao controle negativo BCG *Pasteur* não transformado, podemos observar a ausência de expressão protéica. Em um estudo prévio a proteína CP40, foi descrita como um alvo promissor tanto para o diagnóstico e vacinas para a Linfadenite Caseosa (D'AFONSECA et al. 2008).

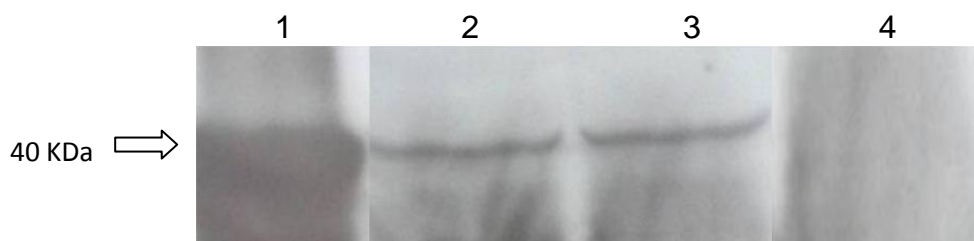


Figura 3: Avaliação da expressão da proteína CP40 em *M. bovis* BCG Pasteur. 1- Proteína recombinante CP40 purificada; 2- rBCG *Pasteur* pUS977/cp40; 3- rBCG *Pasteur* pUS2000/cp40. 4- BCG *Pasteur* não transformado (controle negativo).

4. CONCLUSÕES

Esse trabalho demonstra que a proteína CP40 de *C. pseudotuberculosis*, foi expressa com sucesso em *M. bovis* BCG. Novos estudos serão realizados em modelo animal, onde possamos obter uma resposta promissora contra a doença Linfadenite Caseosa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COSTA, A.C., NOGUEIRA, S.V., KIPNIS, A., KIPNIS, A, J., Recombinant BCG: innovations on an old vaccine. Scope of BCG strains and strategies to improve long-lasting memory. **Frontiers in immunology**, 2014.

D'AFONSECA, V.D., MORAES, P.M., DORELLA, F.A., PACHECO, L.G.C., 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.** 7 (1): 252-260, 2008.

DENG, Y.H., HE, H.Y. ZHANG, B.S. Evaluation of protective efficacy conferred by a recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing a fusion protein of Ag85A-ESAT-6. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, 2013.

DORELLA, F.A., PACHECO, L.G., SEYFFERT, N., PORTELA, R.W., MEYER, R., MIYOSHI, A. AZEVEDO, V. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. **Expert. Rev. Vaccines**. 8, 205-213, 2009.

HOELZLE, L.E., SCHERRER, T., MUNTWYLER, J., WITTENBRINK, M.M., PHILIPP, W. HOELZLE, K. Differences in the antigen structures of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the induced humoral immune response in sheep and goats. **Vet. Microbiol.** 164, 359-365, 2013.

KAUFMANN, S.H. Recombinant live vaccine candidates against tuberculosis. **Curr. Opin. Biotechnol.** 23, 900-907, 2012.

RIZZI, C., BIANCO, M.V., BLANCO, F.C., SORIA, M., GRAVISACO, M.J., MONTENEGRO, V., VAGNONI, L., BUDDLE, B., GARBACCIO, S., DELGADO, F., LEAL, K.S., CATALDI, A.A., DELLAGOSTIN, O.A. BIGI, F. Vaccination with a BCG strain overexpressing Ag85B protects cattle against *Mycobacterium bovis* challenge. **PLoS. One**. 7, e 51396, 2012.

SUN, R., SKEIKY, Y.A., IZZO, A., DHEENADHAYALAN, V., IMAM, Z., PENN, E., STAGLIANO, K., HADDOCK, S., MUELLER, S., FULKERSON, J., SCANGA, C., GROVER, A., DERRICK, S.C., MORRIS, S., HONE, D.M., HORWITZ, M.A., KAUFMANN, S.H. SADOFF, J.C. Novel recombinant BCG expressing perfringolysin O and the over-expression of key immunodominant antigens; pre-clinical characterization, safety and protection against challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. **Vaccine** 27, 4412-4423, 2009.

TRICCAS, J.A. Recombinant BCG as a vaccine vehicle to protect against tuberculosis. **Bioeng. Bugs**. 1, 110-115, 2010.

WALKER, J., JACKSON, H.J., EGGLETON, D.G., MEEUSEN, E.N., WILSON, M.J. BRANDON, M.R. Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. **Infect. Immun.** 62, 2562-2567, 1994.

WILSON, M.J., BRANDON, M.R. WALKER, J. Molecular and biochemical characterization of a protective 40-kilodalton antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Infect. Immun.** 63, 206-211, 1995.