

## **AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO EM CAMUNDONGOS DAS FORMULAÇÕES VACINAIS CONTENDO AS PROTEÍNAS RECOMBINANTES NanH e PknG DE *C. pseudotuberculosis* UTILIZANDO DIFERENTES ADJUVANTES**

PÂMELLA DA COSTA<sup>1</sup>; NICOLE RAMOS SCHOLL<sup>2</sup>; RODRIGO ALBERTHO ALMEIDA WEDY<sup>3</sup>; FERNANDA KANAAN DE AZAMBUJA<sup>4</sup>; SIBELE BORSUK<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas– [pamelladacosta2002@gmail.com](mailto:pamelladacosta2002@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [nicoleramosscholl@hotmail.com](mailto:nicoleramosscholl@hotmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas– [wedy.rodrigo@gmail.com](mailto:wedy.rodrigo@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [nandakanaan\\_02@hotmail.com](mailto:nandakanaan_02@hotmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [sibeleborsuk@gmail.com](mailto:sibeleborsuk@gmail.com)

### **1. INTRODUÇÃO**

A Linfadenite Caseosa (LC) é uma enfermidade crônica e insidiosa que afeta sobretudo pequenos ruminantes, sendo ocasionada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* (SELIM *et al.*, 2021). A LC resulta em perda de peso, redução na produção de lã e leite, deficiências reprodutivas e impacto financeiro negativo, devido ao abate de animais contaminados, com registros em nível global (BRUNDAGE; BURMAYAN, 2021).

A principal via de transmissão da LC é de animal para animal, principalmente através do contato direto com as bactérias expelidas por abscessos originados por *C. pseudotuberculosis*, além da possível contaminação do ambiente. A bactéria se prolifera e se espalha através da circulação sanguínea, eventualmente infectando os gânglios linfáticos e órgãos internos (BRUNDAGE; BURMAYAN, 2021).

Os principais obstáculos na busca por uma imunoprofilaxia eficaz da LC envolvem a necessidade de aprimorar a eficácia da vacinação e garantir sua administração apropriada, em conjunto com medidas de manejo sanitário por parte dos criadores (PINHO *et al.*, 2021).

Proteínas como a NanH e a PknG estão envolvidas em processos de adesão e invasão celular, aquisição de nutrientes e evasão do sistema imunológico do hospedeiro, o que pode desempenhar um papel muito importante na virulência e patogenicidade de *C. pseudotuberculosis* (SILVA *et al.*, 2021). Silva *et al.* (2020) empregaram as proteínas recombinantes NanH e PknG em formulações de vacinas contra *C. pseudotuberculosis*, alcançando uma taxa de proteção de 60% nos animais submetidos ao desafio com a cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*. Esses resultados indicam que a combinação dessas proteínas pode ter impactos benéficos em vacinas contra a linfadenite caseosa (SILVA *et al.*, 2020).

Além do antígeno em si, para a composição da vacina também são utilizados adjuvantes, eles auxiliam no aumento de respostas imunológicas específicas contra antígenos contidos na vacina (HE; ZOU; HU, 2015). O hidróxido de alumínio é um adjuvante caracterizado por mecanismos que incluem o efeito de reservatório, estímulo pró-fagocitário e indução da via pró-inflamatória. Ademais, ele é capaz de potencializar as respostas celulares Th1 e Th2 (HE; ZOU; HU, 2015). Por outro lado, a saponina constitui um adjuvante cujo mecanismo de ação se fundamenta na ativação das células T TH1 e CD8, resultando na promoção de uma resposta imune robusta e equilibrada, além de desencadear respostas mediadas por células com o mínimo de reatogenicidade (SILVA *et al.*, 2021).

Nessa perspectiva, o propósito deste estudo consiste em avaliar a eficácia da imunização proporcionada por uma vacina que contenha as proteínas NanH e

PknG, bem como determinar qual adjuvante, entre a saponina e o hidróxido de alumínio, apresentaria uma maior capacidade de aprimoramento para a obtenção da máxima taxa de proteção contra a infecção causada por *C. pseudotuberculosis*.

## 2. METODOLOGIA

Foram utilizadas duas cepas de *C. pseudotuberculosis*: a cepa atenuada 1002 e a cepa patogênica MIC-6, ambas as cepas foram cultivadas em meio de cultura BHI. Além disso, no âmbito deste estudo, as cepas de *Escherichia coli* TOP 10 e BL21 Star foram utilizadas, sendo ambas cultivadas em meio Luria-Bertani (LB).

O plasmídeo pd444-NH/pknG foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Genética Celular e Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais. O plasmídeo pAE/nanH foi previamente construído pelo nosso grupo de pesquisa. O gene nanH foi amplificado por PCR, e o produto desse PCR e o vetor pAE foram subsequentemente digeridos e purificados. Para efetuar a ligação do gene nanH ao vetor pAE, utilizamos 1 U da enzima T4 DNA Ligase. O plasmídeo resultante dessa recombinação foi denominado pAE/nanH.

Os plasmídeos recombinantes pAE/nanH e pD444-pknG foram submetidos a um processo de transformação por choque térmico e, como resultado, foram introduzidos na bactéria *E. coli* BL21 Star. Posteriormente, ocorreu a expressão dessas proteínas recombinantes. Em seguida, as proteínas recombinantes foram purificadas através de cromatografia de afinidade por níquel, seguida de um processo de diálise para permitir o correto dobramento das proteínas. Finalmente, para confirmar a identidade dessas proteínas recombinantes, foi realizado um ensaio de Western blotting.

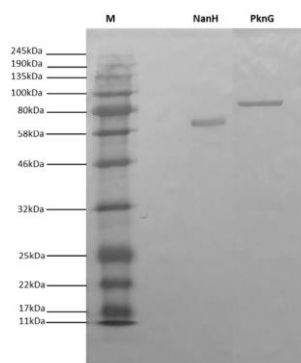
Para a condução do experimento de imunização e desafio, foram utilizados 30 camundongos fêmeas da linhagem Balb/C com idades compreendidas entre 6 a 8 semanas, todos suscetíveis à infecção por *C. pseudotuberculosis*. O referido experimento recebeu a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, sob o protocolo número 12522-2019, e estritamente seguiu as diretrizes estabelecidas pela Comissão Nacional de Bem-Estar Animal. Todos os animais foram mantidos em condições padronizadas nas instalações do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas.

Os animais foram distribuídos em três grupos, cada um composto por 10 indivíduos, identificados como: Solução Salina 0,9% (G1); rNanH + rPknG + Saponina (G2), no qual os animais foram inoculados com uma solução contendo 50 µg de cada proteína recombinante, acompanhada de 7,5 µg do adjuvante saponina; e rNanH + rPknG + Al(OH)<sub>3</sub> (G3), cujos animais foram inoculados com uma solução contendo 50 µg de cada proteína recombinante e 15% de Al(OH)<sub>3</sub>. Os camundongos foram submetidos à imunização por via subcutânea, recebendo duas doses da vacina, com um intervalo de 21 dias entre as aplicações. Após a última imunização, decorridos 21 dias, os animais foram desafiados com uma injeção intraperitoneal contendo 2x10<sup>4</sup> UFC/ml da cepa virulenta *C. pseudotuberculosis* MIC-6 e monitorados por um período de 50 dias. Os critérios de *endpoint* foram rigorosamente observados, e, quando alcançados, os animais foram submetidos à eutanásia utilizando isoflurano.

Como estatística para verificar as diferenças nas taxas de mortalidade e sobrevivência entre os animais imunizados e o grupo controle foi utilizado o Teste Exato de Fisher e o Teste Log-Rank. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software GraphPad Prism v.7. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

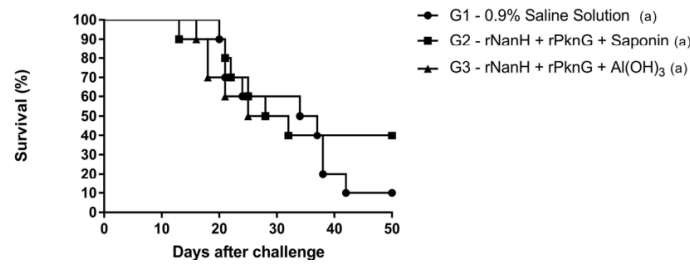
As proteínas recombinantes foram expressas na cepa *E.coli* BL21 Star e, subsequentemente, solubilizadas em uma solução de ureia 8M. A confirmação da identidade das proteínas recombinantes ocorreu por meio da técnica de Western blot, na qual foram visualizadas bandas reativas com os tamanhos esperados de aproximadamente 70 kDa para a rNanH e 80 kDa para a rPknG, conforme exemplificado na Figura 1.



**Figura 1.** Caracterização de identidade das proteínas recombinantes NanH e PknG. Western Blot análise de proteínas NanH e PknG usando um anticorpo monoclonal anti-6x His tag (Sigma Aldrich). (1) Marcador; (2) rNanH purificado; e (3) rPknG purificado. rNanH e rPknG são mostradas como bandas reativas de aproximadamente 70 kDa (2) e 80 kDa (3), respectivamente.

Os resultados relativos à proteção dos três grupos empregados no experimento são apresentados na Figura 2. Nesta figura, é possível observar que, dos dez animais pertencentes ao grupo de controle negativo, nove atenderam aos critérios de *endpoint*. Em comparação, os dois grupos experimentais, designados como G2 e G3, demonstraram níveis de proteção de 40%. Pode-se notar que a formulação vacinal contendo associação de antígenos demonstrou uma proteção superior à do grupo controle, embora não tenha alcançado significância estatística em relação ao controle e não tenha atingido um nível de proteção desejado. Silva *et al.* (2020) empregaram as proteínas recombinantes NanH e PknG separadamente em formulações vacinais contra *C. pseudotuberculosis*, alcançando uma taxa de proteção de 60% na vacina que continha a proteína recombinante NanH (SILVA *et al.*, 2020), porém, o mesmo não foi possível de ser atingido em nosso estudo, acreditamos que isso tenha ocorrido por conta da associação com a PknG. Conforme Santana-Jorge *et al.* (2016) afirmou que a localização da PknG é citoplasmática, e por isso acreditamos que pode ter limitado seu processamento e, portanto, dificultado o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz (SANTANA-JORGE *et al.*, 2016).

Por outro lado, além da combinação de antígenos, também avaliamos a inclusão de diferentes adjuvantes nas formulações vacinais, especificamente o hidróxido de alumínio e a saponina. Como pode ser observado na Figura 2, não conseguimos determinar qual adjuvante seria mais eficaz para a formulação vacinal. Conforme Brum *et al.* (2017) se obteve 58.3% de proteção usando hidróxido de alumínio como adjuvante associado a rCP09720 para LC (BRUM *et al.*, 2017). Segundo Bezerra *et al.* (2021) a utilização de saponina como adjuvante em associação com rCP01850 protegeu 60% contra a infecção por *C. pseudotuberculosis* (BEZERRA *et al.*, 2021).



**Figura 2.** Taxas de sobrevivência de camundongos Balb/c imunizados com proteínas rNanH + rPknG e diferentes adjuvantes após desafio com a cepa virulenta *C. pseudotuberculosis* MIC-6. Os dados foram obtidos utilizando dez camundongos para cada grupo, que foram monitorados por 50 dias após o desafio. Curvas de sobrevivência foram comparados usando análise log-rank e teste exato de Fisher e considerados estatisticamente significativo quando  $p < 0.05$ .

#### 4. CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos nos experimentos, evidencia-se que as formulações vacinais demonstraram a capacidade de conferir proteção parcial aos animais desafiados. Adicionalmente, destaca-se a caracterização das proteínas rNanH e rPknG como alvos vacinais promissores, representando um marco significativo no desenvolvimento de vacinas contra o LC. No entanto, a obtenção de uma compreensão mais aprofundada sobre o adjuvante ideal requer a realização de estudos suplementares, incluindo a avaliação da resposta imunológica humoral e celular, visando esclarecer esta questão.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SELIM, Ahmed Magdy; ATWA, Samar Magdy; GEDAWY, Attia Abdullah El; YOUNIS, Emad Elsayed. Epidemiological, bacteriological and molecular studies on caseous lymphadenitis in sheep of Dakhlia, Egypt. **Animal Biotechnology**, [S.L.], v. 33, n. 7, p. 1655-1660, 24 maio 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10495398.2021.1928683>.
- BRUNDAGE, Cord; BURMAYAN, Angela. Caseous lymphadenitis outbreak in a small ruminant herd. **Open Veterinary Journal**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 530, 2021. ScopeMed. <http://dx.doi.org/10.5455/ovj.2021.v11.i4.2>.
- PINHO, Rodrigo Barros de; SILVA, Mara Thais de Oliveira; BEZERRA, Francisco Silvestre Brilhante; BORSUK, Sibebe. Vaccines for caseous lymphadenitis: up-to-date and forward-looking strategies. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 105, n. 6, p. 2287-2296, mar. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-021-11191-4>.
- SILVA, Mara Thais de Oliveira *et al.* In silico analyses and design of a chimeric protein containing epitopes of SpaC, PknG, NanH, and SodC proteins for the control of caseous lymphadenitis. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 105, n. 21-22, p. 8277-8286, 8 out. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-021-11619-x>.
- HE, Peng; ZOU, Yening; HU, Zhongyu. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 477-488, fev. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21645515.2014.1004026>.