

DESENVOLVIMENTO DE VACINAS DE DNA UTILIZANDO OS GENES *cp0369* E *cp1802* DE *Corynebacterium pseudotuberculosis*

LEAL, KAREN S; REZENDE, ANDREA DE FATIMA S; BRUM, ALEXANDRE A;
FELICETTI, CRISTIANE P.D; ANGELO, HENRIQUE R; BORSUK, SIBELE.

¹Centro de desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia–UFPEL karensleal@hotmail.com

²Centro de desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia–UFPEL andreabiomedica@hotmail.com

²Centro de desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia–UFPEL alex.brum@bol.com.br

²Centro de desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia–UFPEL hrangelo@gmail.com

²Centro de desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia–UFPEL crispdias@yahoo.com.br

³Centro de desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia–UFPEL sibeleborsuk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A Linfadenite caseosa (LC), é uma doença infecciosa crônica causada por uma bactéria gram positiva *Corynebacterium pseudotuberculosis*, é caracterizada por formar abscessos crônicos, aumento dos linfonodos superficiais e viscerais e também dos órgãos internos como os pulmões. A incapacidade de diagnosticar a infecção assintomática resulta em uma alta transmissão da doença entre os animais (HOELZLE et al. 2013). A disseminação da doença se dá também a ineficácia dos antibióticos por não conseguirem acessar à espessa cápsula de tecido conectivo que reveste os abscessos típicos e o denso conteúdo caseoso presente no interior dos piogranulomas (BAIRD; FONTAINE 2007).

A LC acomete principalmente pequenos ruminantes como cabras e ovelhas, causando grandes perdas econômicas, como menor produção de lã, animais apresentando baixo peso, 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).

Muitos alvos foram identificados com sequenciamento e análise proteômica, dentre eles pode-se citar os genes *cp1002_0369* e *cp1002_1802*. O gene *cp1002_0369* codifica uma proteína secretada sendo esta provavelmente uma fosfoesterase (SANTOS et al. 2012), já o gene *cp1002_1802* codifica para uma possível lipase. Essas são potencialmente antigênicas, e podem ser utilizadas no desenvolvimento de vacinas recombinantes.

O objetivo desse trabalho foi desenvolver vacinas de DNA utilizando os genes *cp1002_0369* e *cp1002_1802* com a finalidade de avaliar o potencial imunoprotetor destas em modelo murino.

2. METODOLOGIA

2.1 Construção das vacinas de DNA

Os genes *cp1002_0369* e *cp1002_1802* foram amplificados por PCR e foram clonados no vetor pTARGET através do kit de clonagem pTARGET™ Mammalian Expression Vector System (Promega, USA) segundo instruções do fabricante. Os produtos das ligações foram usados para transformar *E. coli* TOP10 por eletroporação. As colônias brancas foram selecionadas e cultivadas em meio LB líquido contendo ampicilina (100µg/mL) por 16 h a 37° C. Após foi realizada a

extração de DNA plasmidial e, a caracterização dos clones foi realizada enzimaticamente através da digestão com a enzima de restrição *EcoRI*. Os clones (pTARGET/0369) e (pTARGET/1802) foram cultivados em um volume de 200 mL de LB, e submetidos à extração de DNA usando o kit Perfectprep Plasmid Maxi (Eppendorf, Alemanha).

2.2 Transfecção

Células CHO (chinese hamster ovary) foram cultivadas em placas de poliestireno de 96 cavidades. Após confluência de 80%, estas células foram transfectadas com 1 µg de DNA dos vetores pTARGET, pTARGET/0369 e pTARGET/1802 utilizando lipofectamine™2000 (Invitrogen) a fim de verificar a expressão da proteína *in vitro*. Após 48 h de incubação, a expressão das proteínas CP0369 e CP1802 foi avaliada por reação de imunofluorescência indireta (RIFI) utilizando os anticorpos policlonais produzidos em camundongos e com anticorpo policlonal conjugado com Fitc (Millipore).

2.4 Imunização e Desafio

Nos ensaios de imunização foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas de seis a oito semanas de idade. Foram realizadas três imunizações com intervalo de 15 dias cada por via intramuscular (IM), os animais foram divididos em 6 grupos com 5 animais cada. O grupo controle positivo (bacterina), obtida a partir da inativação de cultivo de *C. pseudotuberculosis* cepa Mic6 e o grupo controle negativo (pTARGET) e os grupos vacinais pTARGET/0369, pTARGET/1802, prime-boost CP0369 e prime-boost CP1802. Sendo o prime-boost composto por duas doses das respectivas vacinas de DNA e um reforço com a proteína recombinante associada a hidróxido de alumínio. As coletas de sangue foram realizadas nos dias 0, 15, 30 e 45 a partir da primeira imunização e estocadas a -20°C. O desafio foi realizado 21 dias após a última dose das vacinas. 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.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteína CP0369 e CP1802 foram expressas em células CHO (chinese hamster ovary), a expressão foi detectada através do método de reação de imunofluorescência indireta (RIFI). (Figura 1)

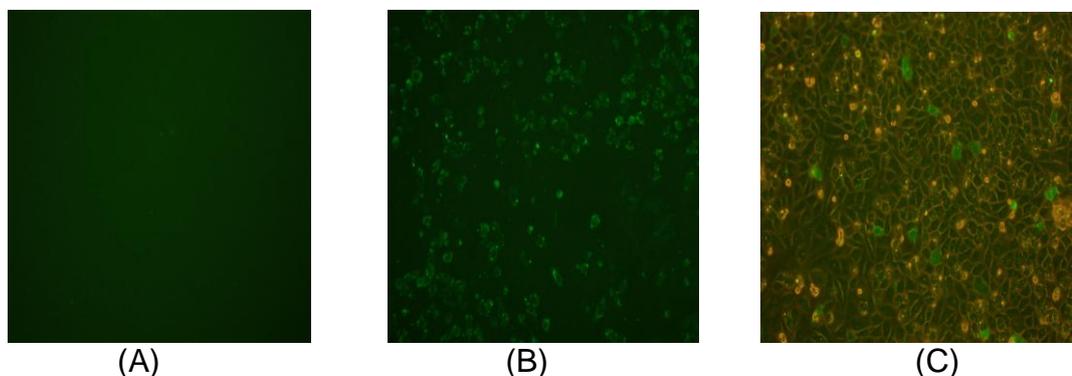


Figura 1: Avaliação da transfecção de células CHO (chinese hamster ovary) com o DNA do vetor pTARGET/0369 e pTARGET por Imunofluorescência Indireta (RIFI).

A: controle negativo (pTARGET). **B:** transfecção de células CHO com pTARGET/0369 e **C:** transfecção de células CHO com pTARGET/1802.

Trinta dias após o desafio foi observado que nenhuma das formulações vacinais testadas conferiu proteção significativa. Os animais vacinados com a bacterina (controle positivo) tiveram uma taxa de sobrevivência de 100%. Os grupos vacinais foram a óbito antes do 20º dia pós-desafio. A taxa de sobrevivência aumentou no grupo vacinado com pTARGET/1802. Em um estudo realizado por COSTA et al. (2011) foi avaliada a taxa de sobrevivência dos animais imunizados com a vacina de DNA Hsp60 e mesmo induzindo produção de anticorpos, estes não foram protetores. Mesmo com a expressão *in vitro* das proteínas CP0369 e CP1802 após a transfecção com as vacinas de DNA, estas não foram eficientes em conferir proteção *in vivo*, possivelmente o nível de expressão não foi suficiente, ou ainda os alvos escolhidos devem ser usados em outras estratégias vacinais como em vacinas vetorizadas.

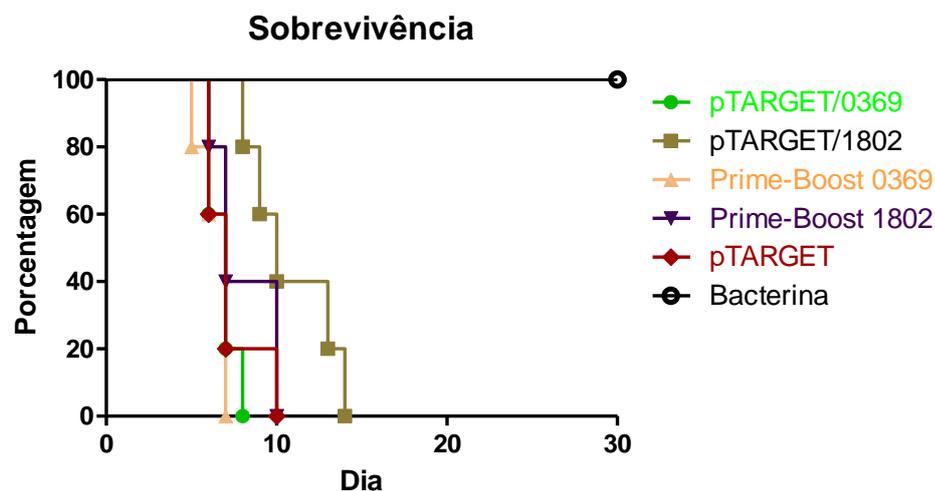


Figura 2: Curva de sobrevivência dos animais imunizados com as diferentes formulações vacinais após desafio com 10^4 UFC de *C. pseudotuberculosis* Mic6

4. CONCLUSÕES

As proteínas CP0369 e CP1802 foram expressas em células CHO, já as formulações vacinais não conferiram proteção após o desafio, a resposta imune humoral será avaliada com a finalidade de analisarmos os níveis de IgG total e seus isotipos.

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.

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.4, p.243, 2011.

DORELLA, F.A., PACHECO, L.G., SEYFFERT, N., PORTELA, R.W., MEYER, R., MIYOSHI, A. AND AZEVEDO, V. Antigenes 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. AND 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.

PINHO, J. M. R.; DORELLA, F.; COELHO, K. S.; FONSECA, C. T.; CARDOSO, F. S.; MEYER, R.; PORTELA, R. W.; OLIVEIRA, S. C.; MYIOSHI, A.; 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**, v.3, p.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.; AZEVEDO, V. The *Corynebacterium pseudotuberculosis* in silico predicted pan-exoproteome. **BMC.Genomics**, v.13 Suppl 5, p.S6, 2012.