

TESTE DE ADSORÇÃO EM HIDRÓXIDO DE ALUMÍNIO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES CANDIDATOS A VACINA CONTRA A ESPOROTRICOSE FELINA

TATIÉLEN HERNANDEZ SEVERO¹; SABRINA DE OLIVEIRA CAPELLA²;
ATHENA CRISTINA DE AZAMBUJA RODRIGUES³; CAROLINA OLIVEIRA
SILVA⁴; SÉRGIO JORGE⁵; RODRIGO CASQUERO CUNHA⁶

¹UFPEl – tatihsevero@gmail.com

²UFPEl – capellas.oliveira@gmail.com

³UFPEl – athenacris@gmail.com

⁴UFPEl – carolinaosilva96@gmail.com

⁵UFPEl – sergiojorgevet@hotmail.com

⁶UFPEl – rodrigocunha_vet@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Esporotricose é uma zoonose mundial, e consiste em uma micose de inoculação provocada por patógenos do gênero *Sporothrix* (RODRIGUES *et al.* 2014). No Brasil, *S. brasiliensis* tem alta prevalência, sendo os felinos domésticos os animais mais acometidos pela infecção (RODRIGUES *et al.* 2013).

A terapia atual indicada em casos de esporotricose felina consiste no uso de antifúngicos orais, que são de alto custo e possuem diversos efeitos adversos (PEREIRA, 2009). O tratamento dura de semanas a meses, sendo que o tempo médio varia de 4 a 9 meses. Após o término do tratamento, recidivas ainda podem ocorrer (CHAVES *et al.*, 2013), representando um grande desafio.

A vacinação de felinos tem papel importante no controle de doenças e na disseminação de zoonoses, podendo, ainda, reduzir a incidência de casos graves (PEDRA, 2020). Contudo, não existe uma vacina comercialmente disponível contra a esporotricose. As formulações vacinais possuem um adjuvante ligado ao antígeno, com a função de modular e intensificar a resposta imune (PASQUALE, 2015). O hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) é um adjuvante bem estabelecido, empregue em diversas formulações vacinais para humanos, como também em diferentes espécies animais (WEN e SHI, 2016).

Este adjuvante compõe muitos produtos licenciados, produzindo forte resposta imune humoral, com anticorpos específicos ao antígeno adsorvido (O'HAGAN, 2015). Para que estas reações imunológicas ocorram da forma desejada, está demonstrado que o antígeno precisa estar adsorvido no Al(OH)₃, o que é decorrente da troca de ligantes, ação das forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas (MANNHALTER, 1985).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a adsorção, no adjuvante Al(OH)₃, de duas proteínas recombinantes compostas por epítomos imunogênicos das proteínas Gp70 e SsEno de *Sporothrix* spp., para posterior uso como vacina de subunidade contra esporotricose felina.

2. METODOLOGIA

Para o teste de adsorção, foram utilizadas duas proteínas quiméricas recombinantes compostas por epítomos das proteínas Gp70 e SsEno de

Sporothrix spp., produzidas por pesquisadores vinculados ao ClinPet, que são candidatas a antígeno vacinal contra a esporotricose felina.

As proteínas recombinantes foram caracterizadas pela técnica de *Western blotting*, a partir da reação destas com anticorpo monoclonal anti-6×Histidina conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich), onde ocorreu a ligação deste anticorpo com a cauda de histidina adicionada ao N-terminal das proteínas, também utilizada como *tag* de afinidade para purificação das quimeras (Figura 1A). Para avaliar a antigenicidade das proteínas recombinantes, uma segunda membrana foi incubada com pool soros de felinos com diagnóstico positivo para esporotricose na diluição 1:500 por 1 h seguido da adição de anticorpo secundário anti-IgG de gato conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich, MO, USA) na diluição 1:5.000. Todas as reações foram realizadas à temperatura ambiente sob agitação orbital por 1 h. Entre as etapas, as membranas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e reveladas com solução cromógena composta por 6 mg de tetrahidrocloro de diaminobenzidina (DAB), 15 µL de H₂O₂ 30%, 9 mL de Tris-HCl 50 mM pH 7,6 e 1 mL de sulfato de níquel 0,3% (NiSO₄) até o desenvolvimento da cor.

A Proteína 1 está em fase de padronização e otimização do Western Blot, enquanto que a Proteína 2, quando exposta ao soro de felinos infectados por *Sporothrix* spp. é reconhecida pelos anticorpos da classe IgG, como demonstrado na Figura 1B.

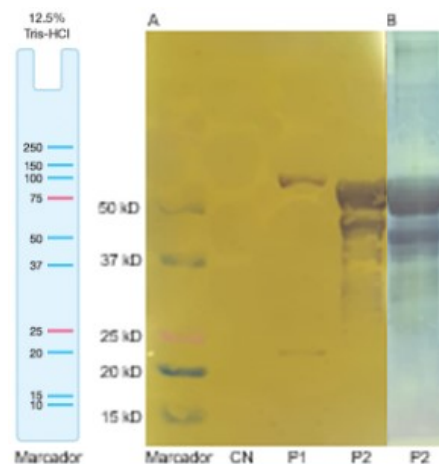


Figura 1 : Demarcação das bandas protéicas pelo *Western Blot*. **A**: Reação utilizando anti-histidina. 1- Marcador de massa molecular (*Precision Plus Protein Standards*); 2- Controle negativo com *Escherichia coli* (CN); 3- Proteína 1 (P1); 4- Proteína 2 (P2). **B**: Teste utilizando a Proteína 2 (P2) e soro de gatos domésticos infectados naturalmente com *Sporothrix* spp.

Neste estudo, testamos a adsorção das duas quimeras no adjuvante Alhydrogel 2%, gentilmente cedido pelo Laboratório de Vacinologia-UFPEL. O processamento iniciou com o preparo das formulações vacinais. As proteínas foram pipetadas em microtubos diferentes, sendo utilizados 50 µL da proteína e 15 µL de Alhydrogel 2% cada, foram homogeneizadas no vortex e incubadas overnight a 4 °C em agitação. Ainda, foi preparado o gel Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) 12%. No dia posterior, as vacinas foram centrifugadas a 8.500 × g à 4 °C durante 15 min, formando um pellet no fundo no microtubo, e os sobrenadantes coletados e transferidos para novos microtubos, sendo centrifugados nas mesmas condições, coletados e transferidos novamente.

Para análise foram utilizados como controles os candidatos a antígenos vacinais, sendo pipetados 20 µL de Proteína 1 em um microtubo e a mesma quantidade de Proteína 2 em um microtubo diferente, mais 5 µL de tampão de amostra 5X e 15 µL de PBS em cada, para obter a mesma concentração da formulação vacinal. O sobrenadante das doses vacinais e os controles foram fervidos a 100 °C por 10 minutos, pipetados e depositados 12,5 µL em diferentes poços do gel SDS-PAGE 12% preparado anteriormente, como também adicionados 3 µL do marcador molecular *Precision Plus Protein Standards* (Bio-Rad, CA, USD) em um poço mais externo e outro central.

A eletroforese foi realizada em cerca de duas horas, a 15 mA iniciando com tensão de 80V e passando para 120V. Após, o gel foi submerso em um recipiente com *coomassie brilliant blue* (CBB), fervido no microondas por 40 segundos, agitado e descartado o corante, sendo realizada uma lavagem com água destilada que foi repetida quatro vezes. Em seguida, o resultado foi observado com o auxílio de um equipamento de transluminescência branca.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gel SDS-PAGE 12% foi analisado utilizando um equipamento que emite luz branca, destacaram-se bandas protéicas de diferentes massas moleculares, manifestadas nos poços que continham o marcador e os controles. As proteínas foram coradas com CBB demonstrando bandas, das quais, se destacando em ambas amostras, uma banda de coloração mais intensa que as demais. Estas bandas foram condizentes com os pesos moleculares de 55,8 kDa, da Proteína 1, e 51,59 kDa, da Proteína 2, já determinados anteriormente, evidenciando que o teste foi feito corretamente.

Nos poços que continham os sobrenadantes vacinais, não foram marcadas bandas proteicas, provando que a ligação entre os antígenos e o adjuvante ocorreu com sucesso, sendo eles totalmente adsorvidos pelo Alhydrogel 2% que permaneceu aderido ao fundo dos microtubos, uma vez que os sobrenadantes utilizados no teste estavam livres dos antígenos.

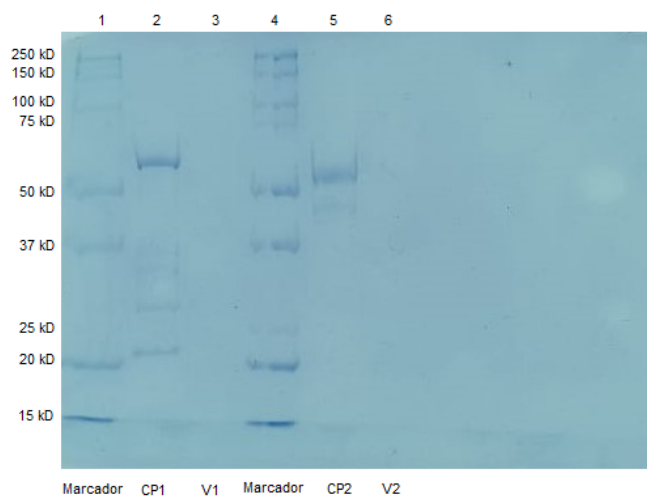


Figura 2. SDS-PAGE 12% resultante do teste de adsorção. 1- *Precision Plus Protein Standards*; 2- Proteína 1 (CP1); 3- Sobrenadante vacinal da formulação com a Proteína 1 (V1); 4- *Precision Plus Protein Standards*; 5- Proteína 2 (CP2) e 6, Sobrenadante vacinal da formulação com a Proteína 2 (V2).

4. CONCLUSÕES

Por meio deste estudo, ficou comprovada a capacidade do $\text{Al}(\text{OH})_3$ em adsorver ambos antígenos vacinais, demonstrando potencial efetividade de formulação. Possibilitando o andamento no estudo da aplicabilidade deste adjuvante nas formulações vacinais, incluindo testes de eficácia e segurança em animais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BECK, Lucinda; SPIEGELBERG, Hans L. The polyclonal and antigen-specific IgE and IgG subclass response of mice injected with ovalbumin in alum or complete Freund's adjuvant. *Cellular immunology*, v. 123, n. 1, p. 1-8, 1989. 5

CHAVES AR, CAMPOS MP, BARROS MBL *et al.* Treatment abandonment in feline sporotrichosis—study of 147 cases. **Zoonoses Public Health** 2013; 60: 149–153.

MANNHALTER, J. W. *et al.* Modulation of the human immune response by the non-toxic and non-pyrogenic adjuvant aluminium hydroxide: effect on antigen uptake and antigen presentation. **Clinical and experimental immunology**, v. 61, n. 1, p. 143, 1985.

O'HAGAN, Derek T.; FOX, Christopher B. New generation adjuvants—from empiricism to rational design. **Vaccine**, v. 33, p. B14-B20, 2015..

PEDRA, A. E., BRUMMET, G. O., CAROZZA, E. M., KASS, P. H., PETERSEN, E. P., SYKES, J., & WESTMAN, M. E. (2020). Diretrizes de vacinação felina AAHA/AAFP 2020. **Revista de medicina e cirurgia felina**, 22(9), 813-830.

PEREIRA SA, SCHUBACH TMP, GREMIAO IDF *et al.* Therapeutic aspects of feline sporotrichosis. **Acta Sci Vet** 2009; 37: 311–321

RODRIGUES AM, De HOOG GS, De CAMARGO ZP. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. **Diagn Microbiol Infect Dis** 2014; 78: 383–387.

RODRIGUES AM, de MELO TEIXEIRA M, de HOOG GS *et al.* Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLoS Negl Trop Dis** 2013; 7: e2281.

RUBIN, R. L. *et al.* IgG subclasses of anti-tetanus toxoid antibodies in adult and newborn normal subjects and in patients with systemic lupus erythematosus, Sjogren's syndrome, and drug-induced autoimmunity. *The Journal of Immunology*, v. 137, n. 8, p. 2522-2527, 1986.

WEN, Yumei; SHI, Yan. Alum: an old dog with new tricks. *Emerging microbes & infections*, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2016.