

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE VACINAS VETORIZADAS PARA O CONTROLE DA LINFADENITE CASEOSA

MARA THAIS DE OLIVEIRA SILVA¹; ANDREA DE FATIMA SILVA REZENDE¹;
FRANCISCO SILVESTRE BRILHANTE BEZERRA¹; RAQUEL NASCIMENTO DAS NEVES², RODRIGO BARROS DE PINHO²; SIBELE BORSUK³

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – marathaisos@gmail.com, andreaabiomedica@hotmail.com, silvestrebrilhante@gmail.com

²Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas (UFPel) –

raquelheees@hotmail.com, rodrigobpinho@hotmail.com

³Centro de Desenvolvimento Tecnológico – sibelevborsuk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A Linfadenite Caseosa (LC) é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis*, uma bactéria gram-positiva, pleomórfica, intracelular facultativa, cosmopolita, encontrada principalmente no solo, na pele ou mucosas dos animais, e que acomete pequenos ruminantes (D'Afonseca et al., 2010).

Os prejuízos econômicos gerados vão desde a depreciação da pele e lã à redução na produção de carne e leite em pequenos ruminantes promovendo perdas econômicas significativas na ovinocaprinocultura em diversos países do mundo, incluindo o Brasil (Guimarães et al., 2011).

A melhor medida preventiva para o combate a LC é a imunização, pois além de o tratamento não ser completamente eficaz apresenta um custo elevado. Vários estudos mostram diferentes estratégias que vêm sendo testadas, como o uso de bactérias atenuadas ou inativadas, frações contendo antígenos da parede da bactéria ou do sobrenadante de cultura bacteriana e ainda uma mistura de componentes celulares e sobrenadante. Todas as formulações ofereceram certo grau de proteção contra infecções experimentais e até mesmo naturais, contudo não são completamente eficazes. (Dorella et al., 2009).

Outra abordagem que pode conferir níveis de proteção satisfatórios é a utilização de vacinas recombinantes vetORIZADAS. Dentre os diversos tipos destas vacinas pode-se citar o *Mycobacterium bovis* BCG, que já se mostrou eficiente em termos de proteção contra várias enfermidades (Bastos et al. 2009). Este vetor vacinal possui várias vantagens, como apresentar propriedades adjuvantes, uma única dose pode conferir uma longa resposta imune, estabilidade e segurança, além de poder ser administrado oralmente e ter um baixo custo de produção quando comparado a outras vacinas vivas (Bastos et al. 2009). Além disso, *M. bovis* BCG pertencem ao grupo dos Actinomicetos, possuindo características semelhantes ao *C. pseudotuberculosis* quanto a estrutura da parede celular, incluindo espessura, presença de ácidos micólicos, ácidos graxos saturados e insaturados (Belchior et al. 2006; Gao et al. 2006).

Assim, considerando a grande e crescente importância da ovinocultura e, contrariamente a este fato, a falta de uma vacina brasileira eficiente contra a LC, este trabalho tem por objetivo expressar a proteína CP0369 de *C. pseudotuberculosis* em *M. bovis* BCG.

2. METODOLOGIA

2.1 Cepas e condições de Cultivo

M. bovis BCG foi cultivado em meio 7H9 (líquido) ou 7H10 (sólido) com

suplementação de OADC (Oleic Albumin Dextrose Catalase) além de suplementação com o antibiótico canamicina (50mg/mL) quando necessário. O cultivo foi realizado a 37 °C por 7 dias em meio 7H9 ou por 21 dias em meio 7H10. *E. coli* foi cultivada em meio LB líquido ou LB-Ágar a 37 °C por 16 h, com suplementação do antibiótico canamicina (50 mg/mL) quando necessário.

2.2 Expressão e purificação da proteína rCP0369

O gene *cp1002_0369* foi amplificado por PCR utilizando primers específicos e ligados no vetor de expressão em *E. coli* pAE (Ramos et al., 2004). Em seguida o produto da ligação foi transformado por eletroporação em *E.coli* TOP10. Os clones recombinantes foram caracterizados enzimaticamente e por sequenciamento de DNA. A expressão da proteína rCP0369 foi realizada na cepa de *E. coli* BL21 Star e a indução foi realizada com 1mM de IPTG. A confirmação da expressão foi verificada através de *Western Blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti-6X-His conjugado com peroxidase (Sigma). A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade ao níquel em coluna de sepharose (HisTrap). A pureza das mesmas foi determinada através de SDS-PAGE e a concentração de proteínas pelo Kit BCA (Pierce).

2.3 Produção de soro policlonal

A proteína purificada foi utilizada para imunização de camundongos para produção de soro policlonal. Para isso, três doses de 15 dias de intervalo de 50 ug de cada proteína adicionada ao adjuvante hidróxido de alumínio foram inoculadas em três camundongos. Ao final o soro foi coletado semanalmente e armazenado a -20 °C para as posteriores análises de *Western Blotting*.

2.4 Construção de BCG expressando a proteína CP0369 de *C. pseudotuberculosis*

O gene *cp1002_0369* foi amplificado por PCR utilizando primers específicos para cada gene e ligados nos vetores de expressão em *M. bovis* BCG (pUS2000 e pUS977) (Dellagostin et al., 1993). Em seguida o produto da ligação foi transformado por eletroporação em *E.coli* TOP10 para obtenção dos clones recombinantes. Após a caraterização enzimática e do sequenciamento de DNA os clones recombinantes foram utilizados para transformação de *M. bovis* BCG por eletroporação. A avaliação de BCG recombinante expressando as proteínas foi realizada por *Western Blotting* utilizando soro polyclonal produzido pela imunização de camundongos com a proteína rCP0369.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene *cp1002_0369* foi amplificado por PCR utilizando primers específicos para cada gene e ligados nos vetores de expressão em *M. bovis* BCG (pUS2000 e pUS977).

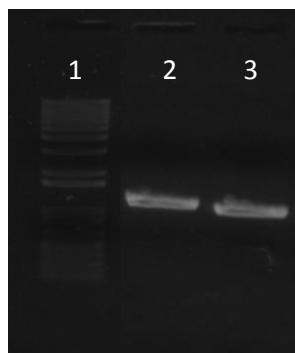


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR. (1): Marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). (2): Gene *Cp1002_0369* contendo o peptídeo sinal (900 pb); (3): Gene *Cp1002_0369* sem o peptídeo sinal (900pb).

Após a caracterização enzimática (Figura 2) os clones recombinantes foram utilizados para transformação de células de *M. bovis* BCG por eletroporação.

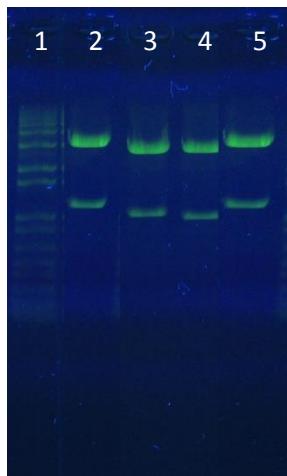


Figura 2: Caracterização dos recombinantes por digestão enzimática utilizando as enzimas *Xba*I e *Hind*III. (1): Marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). (2): pUS977/0369 contendo o peptídeo sinal; (3): pUS977/0369 sem o peptídeo sinal F; (4): pUS2000/0369 contendo o peptídeo sinal; (5): pUS2000/0369 sem o peptídeo sinal.

A avaliação de BCG recombinante expressando a proteína CP0369 foi realizada por *Western Blotting* utilizando soro policlonal produzido pela imunização de camundongos com a proteína rCP0369 (Figura 3). Pode-se observar que obtivemos a expressão da proteína CP0369 em BCG *Pasteur*. Em um estudo abordado por Moore et al. (2000) uma cepa de *C. pseudotuberculosis* mutante, através da deleção do gene PLD, denominada *Toximinus*, foi utilizada como vetor vivo para expressar vários抗ígenos candidatos a vacinas para ovelhas. Nesse trabalho foi demonstrado que houve sucesso na expressão de três antígenos que provocaram uma resposta humoral considerável.

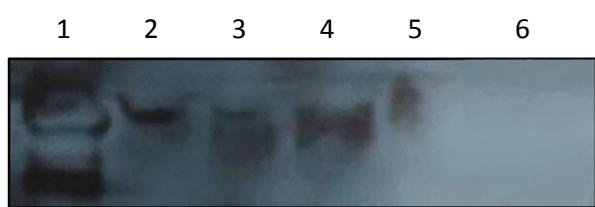


Figura 3: *Western Blotting* utilizando anticorpo policlonal anti-rCP0369. (1): Proteína recombinante rCP0369 purificada; (2): pUS977/cp0369 sem peptídeo sinal; (3): pUS977/cp0369 com peptídeo sinal; (4): pUS2000/cp0369 sem peptídeo sinal; (5): pUS2000/cp0369 com peptídeo sinal.

4. CONCLUSÕES

A clonagem e expressão do gene *cp1002_0369* nos vetores pUS977 e pUS2000 foi realizada com sucesso e a avaliação da expressão da CP0369 em *M. bovis* BCG foi confirmada através de *Western Blotting*, a próxima etapa será a avaliação das vacinas vetorizadas em camundongos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASTOS, R.G., BORSUK, S., SEIXAS, F.K., DELLAGOSTIN, O.A. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. **Vaccine**, v.27, p.6495-6503, 2009.

BELCHIOR, S.E., GALLARDO, A., ABALOS, A., JODO, N., JENSEN, O. Actualizacion sobre linfoadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. **Revista Veterinaria Argentina**, v.23, n.224, p.258-278, 2006.

D'AFONSECA, V., PROSDOCIMI, F., DORELLA, F.A., PACHECO, L.G., MORAES, P.M., PENA, I., ORTEGA, J.M., TEIXEIRA, S., OLIVEIRA, S.C., COSER, E.M., OLIVEIRA, L.M., CORREA DE, O.G., MEYER, R., MIYOSHI, A. AND AZEVEDO, V. Survey of genome organization and gene content of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Microbiological Research**, v.165, n.4, p.312-320, 2010.

DELLAGOSTIN, O.A., WALL, S., NORMAN, E., OSHAUGHNESSY, T., DALE, J.W., MCFADDEN, J. Construction and Use of Integrative Vectors to Express Foreign Genes in Mycobacteria. **Molecular Microbiology**, v.10, n.5, p.983-993, 1993.

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 Review of Vaccines**, v.8, n.2, p.205-213, 2009.

GAO, B., PARAMANATHAN, R., GUPTA, R.S. Signature proteins that are distinctive characteristics of Actinobacteria and their subgroups. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.90, n.1, p.69-91, 2006.

GUIMARÃES, A.S., CARMO, F.B., PAULETTI, R.B., SEYFFERT, N., RIBEIRO, D., LAGE, A.P., HEINEMANN, M.B., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V., GOUVEIA, A.M.G. Caseous lymphadenitis: Epidemiology, diagnosis, and control. **The II OAB Journal**, v.2, n.2, p.33-43, 2011.

MOORE, R. J., ROTHEL, L., KRYWULT, J., RADFORD, A. J., LUND, K., & HODGSON, A. L. Foreign gene expression in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: development of a live vaccine vector. **Vaccine**, v.18, n.5, p.487-497, 1999.

RAMOS, C.R., ABREU, P.A., NASCIMENTO, A.L., HO, P.L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, n.8, p.1103-1109, 2004.