

PROTEÇÃO INDUZIDA POR *Mycobacterium bovis* BCG EXPRESSANDO A PROTEÍNA PLD DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* EM CAMUNDONGOS

FERNANDA KEGLES¹; KAREN SILVA LEAL²; FRANCISCO SILVESTRE BRILHANTE³; ANDREA DE FÁTIMA SILVA REZENDE⁴; MARA THAIS DE OLIVEIRA SILVA⁵; SIBELE BORSUK⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – fkegles@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – karensleal@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – silvestrebrilhante@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – andreabiomedica@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – marathaisos@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – sibeleborsuk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A Linfadenite Caseosa (LC) é uma doença infectocontagiosa, de ocorrência mundial, caracterizada principalmente pelo desenvolvimento de abscessos encapsulados em linfonodos superficiais e viscerais (WILLIAMSON, 2001; PATON et al., 2003). É uma enfermidade crônica que acomete pequenos ruminantes e é causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, uma bactéria gram-positiva, não esporulada, anaeróbica facultativa e intracelular facultativa (D'AFONSECA et al., 2010). A LC causa sérias perdas econômicas na ovinocaprinocultura em decorrência da alta prevalência (D'AFONSECA et al., 2008). A imunização é a melhor medida preventiva, entretanto, ainda não existe uma vacina eficiente e protetora para o controle desta doença.

Tendo em vista a obtenção de uma vacina protetora e mais segura, diversas estratégias têm sido utilizadas, como vacinas recombinantes de subunidade e vacinas de DNA (BASTOS et al., 2012). Ambas apresentam potencial protetor sem riscos de causar a doença. As vacinas recombinantes vetorizadas são outra alternativa e podem conferir níveis de proteção satisfatórios. Dentre os diversos tipos destas vacinas é possível citar o *Mycobacterium bovis* BCG, que já se mostrou eficiente em termos de proteção contra várias enfermidades (BASTOS et al., 2009; RIZZI et al., 2012; DENG et al., 2014). Diferentes alvos vacinais têm sido analisados para o controle da LC, dentre eles pode-se citar a fosfolipase D (PLD), um dos principais fatores de virulência de *C. pseudotuberculosis*, acredita-se desempenhar um papel importante na disseminação do microrganismo durante a formação dos abscessos (MCKEAN et al., 2007).

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial imunológico e imunoprotetor de *M. bovis* BCG Pasteur expressando a fosfolipase D de *C. pseudotuberculosis* em camundongos.

2. METODOLOGIA

Para construção dos vetores de expressão em *M. bovis* BCG, o gene *pld* foi amplificado por PCR utilizando primers específicos e ligado nos sítios *Xba*I e *Hind*III dos vetores de expressão (pUS977 e pUS2000) (DELLAGOSTIN et al., 1993). O vetor pAE/*pld*, previamente construído, foi utilizado para transformar a cepa de *E. coli* BL21 (DE3) Star. A expressão da proteína rPLD foi induzida com 1mM de

Isopropil β -D-1-tiogalactopiranósido (IPTG). A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade ao níquel em coluna de sepharose (HisTrap).

A proteína recombinante rPLD purificada (100 μ g adicionadas ao adjuvante incompleto de Freund) foi utilizada para imunização de dois camundongos, para produção de um soro policlonal, em 3 doses (0, 14 e 21 dias).

O *M. bovis* BCG expressando a proteína PLD denominados BCG/pUS977/*pld* e BCG/pUS2000/*pld*, foram cultivados em meio 7H9 líquido e utilizados para preparação das vacinas. Os cultivos foram centrifugados a 4.000g por 15 min e o pellet suspenso em um volume adequado de solução salina estéril para obter-se uma concentração de 10^6 UFC/mL. Um volume de 0,1 mL desta suspensão foi utilizado para vacinar camundongos por via intraperitoneal.

As vacinas recombinantes (BCG/pUS977/*pld* e BCG/pUS2000/*pld*) foram utilizadas na inoculação dos camundongos BALB/c fêmeas com 6 a 8 semanas de idade. Sete grupos de 8 animais foram inoculados por via intraperitoneal, contando o dia zero (dia da inoculação) e um reforço 21 dias após a primeira dose. O desafio foi realizado 21 dias após a última dose das vacinas com 10^4 UFC da cepa virulenta Mic-6 de *C. pseudotuberculosis* por inoculação intraperitoneal. Os animais foram observados por 60 dias após o desafio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteína recombinante rPLD foi expressa na forma insolúvel, e um rendimento de aproximadamente 5 mg/L foi obtido. A identidade das proteínas recombinantes foi determinada por *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-6xhis, que apresentaram o tamanho esperado de 31 kDa.

A proteína PLD foi expressa em *M. bovis* BCG sob controle de dois promotores pAN e 18kDa, presente nos vetores pUS977 e pUS2000, respectivamente (Figura 1).



Figura 1: *Western blotting* utilizando anticorpo polyclonal anti-rPLD. (1): Proteína recombinante PLD. (2): *M. bovis* BCG transformado com pUS977/PLD. (3): *M. bovis* BCG transformado com pUS2000/PLD.

Foi possível observar a taxa de sobrevida dos animais vacinados observados por um período de 60 dias após desafio. Os grupos de camundongos que receberam o *M. bovis* BCG expressando a proteína PLD (*M. bovis* BCG/pUS977/*pld* e *M. bovis* BCG/pUS2000/*pld*) tiveram uma taxa de 80% de proteção.

A fosfolipase D recombinante (rPLD) associada a uma bacterina preparada a partir da cepa *C. pseudotuberculosis* 3/99-5, foi utilizada para imunização de ovinos e nenhuma evidencia de infecção foi detectada nos animais imunizados com essa composição vacinal (FONTAINE et al., 2006). Em outro estudo, a rPLD foi associada a células inteiras inativadas de *C. pseudotuberculosis* conferindo uma proteção de 72%, já quando a rPLD foi associada com o *M. bovis* BCG demonstrou 66% de proteção, comprovando a importância da fosfolipase D como fator de proteção nos animais quando desafiados com uma cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis* (SELIM et al., 2012).

A fosfolipase D já foi utilizada como vacina recombinante de subunidade e em associação com vacinas atenuadas conferindo proteção (D'AFONSECA et al., 2008). Acreditamos que as vacinas veteorizadas, principalmente as que utilizam *M. bovis* BCG podem promover um nível de proteção maior.

4. CONCLUSÕES

O estudo demonstra o potencial do *M. bovis* BCG Pasteur expressando a proteína PLD de *C. pseudotuberculosis*. Uma vacina contendo essa proteína pode se tornar efetiva no controle da LC, por isso, mais experimentos estão sendo realizados para comprovar a sua eficácia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BABIUK, L.A. et al. Nucleic acid vaccines: research tool or commercial reality. **Veterinary immunology and immunopathology**, Amsterdam, v. 76, n. 1, p. 1-23, 2000.
- BASTOS, R.G. et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. **Vaccine**, Amsterdam, v. 27, n. 47, p. 6495-6503, 2009.
- D'AFONSECA, V. et al. A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. **Genet Mol Res**, Brasil, v. 7, p. 252-260, 2008.
- D'AFONSECA, V. et al. Survey of genome organization and gene content of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Microbiological research**, Dinamarca, v. 165, n. 4, p. 312-320, 2010.
- DELLAGOSTIN, O.A. et al. Construction and use of integrative vectors to express foreign genes in mycobacteria. **Molecular microbiology**, Áustria, v. 10, n. 5, p. 983-993, 1993.
- DENG, Y.; HE, H.; ZHANG, B. Evaluation of protective efficacy conferred by a recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing a fusion protein of Ag85A-ESAT-6. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, China, v. 47, n. 1, p. 48-56, 2014.
- MCKEAN, S.C.; DAVIES, J.K.; MOORE, R.J. Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. **Microbiology**, Reino Unido, v. 153, n. 7, p. 2203-2211, 2007.
- PATON, M. W. et al. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. **Australian veterinary journal**, Austrália, v. 81, n. 1-2, p. 91-95, 2003.
- RIZZI, C. et al. Vaccination with a BCG strain overexpressing Ag85B protects cattle against *Mycobacterium bovis* challenge. **PLoS one**, Estados Unidos, v. 7, n. 12, p. e51396, 2012.
- SELIM, S.A. et al. Synergistic haemolytic activity and its correlation to phospholipase D productivity by *Corynebacterium pseudotuberculosis* Egyptian isolates from sheep and buffaloes. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brasil, v. 43, n. 2, p. 552-559, 2012.
- WILLIAMSON, L.H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, Estados Unidos, v. 17, n. 2, p. 359-71, vii, 2001.