

## AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE PROTEÇÃO IMUNOLÓGICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS VERMELHA ASSOCIADO À PROTEÍNA RECOMBINANTE CP40 DE *Corynebacterium pseudotuberculosis*

KARINA PEREIRA LUDUVICO<sup>1</sup>; MARA THAIS DE OLIVEIRA SILVA<sup>2</sup>, KAREN SILVA LEAL<sup>2</sup>; ANDRÉA DE FÁTIMA SILVA REZENDE<sup>2</sup>; FRANCISCO SILVESTRE BRILHANTE BEZERRA<sup>2</sup>; SIBELE BORSUK<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas – [karina-lsvc@hotmail.com](mailto:karina-lsvc@hotmail.com)

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas – [marathaisos@gmail.com](mailto:marathaisos@gmail.com), [karensleal@hotmail.com](mailto:karensleal@hotmail.com), [andreaobiomedica@hotmail.com](mailto:andreaobiomedica@hotmail.com), [silvestrebrilhante@gmail.com](mailto:silvestrebrilhante@gmail.com)

<sup>3</sup>Centro de Desenvolvimento Tecnológico – [sibelevborsuk@gmail.com](mailto:sibelevborsuk@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença infecciosa causada pela bactéria Gram positiva *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que acomete ovinos e caprinos, acarretando perdas econômicas e morte de muitos animais (SOUZA et al., 2011). No cenário atual, ainda não há vacinas eficazes para a prevenção da doença. Desse modo, pesquisas sobre vacinas recombinantes tornam-se uma boa alternativa para a imunização dos rebanhos (GUIMARÃES et al., 2011).

A proteína recombinante rCP40, uma serina protease de *C. pseudotuberculosis* foi recentemente descrita como um bom alvo vacinal para a LC, e, quando associada à saponina foi capaz de conferir um nível de proteção de 90% (SILVA et al., 2014). No entanto, vacinas de subunidade recombinantes, por serem altamente purificadas e normalmente pouco imunogênicas, necessitam de adjuvantes, que são substâncias capazes de potencializar a imunogenicidade do antígeno (RESENDE et al., 2004).

A própolis vermelha brasileira, uma substância natural complexa produzida pelas abelhas a partir de resina avermelhada já teve sua composição química revelada e apresentou potencial atividade antimicrobiana e antioxidante (CABRAL et al., 2009). Entretanto, seu potencial imunoprotetor enquanto adjuvante vacinal ainda não foi avaliado.

Diante da necessidade de vacinas eficientes para linfadenite caseosa e a procura por potentes adjuvantes, este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de imunoproteção de diferentes doses do extrato etanólico de própolis vermelha associada ao antígeno rCP40 em vacinas de subunidade recombinantes contra a LC em camundongos.

### 2. METODOLOGIA

Para a expressão da proteína recombinante utilizou-se o plasmídeo pAE/CP40 previamente construído (SILVA et al., 2014). Esse plasmídeo foi então transformado por choque térmico em *E. Coli* BL21, e as bactérias recombinantes foram cultivadas em LB contendo 1 mM de IPTG por 3 h a 37°C em agitador.

Para a purificação da proteína recombinante, a cultura bacteriana foi centrifugada e o pellet foi suspenso em tampão salino fosfato (PBS, pH 7,4) contendo 100 mg/ml de lisozima, sonicado 15 vezes por 15 seg (20 Khz). Após centrifugação a 7000 rpm por 15 min. a 4°C, o pellet foi solubilizado com tampão Akta Wash com uréia a 8 M (200 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 500 mM NaCl, 5 mM Imidazole; 8 M Urea pH 8,0). A proteína recombinante foi purificada utilizando a coluna de

cromatografia por afinidade HisTrap™ HP (GE Healthcare, USA). Em seguida procedeu-se à diálise. Para avaliação da identidade da proteína, foi realizado um *Western Blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti-6XHis.

A própolis vermelha foi obtida no município de Brejo Grande, SE ( $S\ 10^{\circ}28'25''$  e  $W\ 36^{\circ}26'12''$ ). Para a produção do extrato etanólico de própolis vermelha (EEP), 4 g de própolis bruta seca foram misturadas a 40 mL de etanol 70%. A mistura foi homogeneizada, filtrada e disposta em placa de petri para secagem. Após a evaporação, um pó vermelho fino foi obtido com rendimento de 35,25%. Esse pó foi reconstituído em PBS 1x para produzir solução estoque de própolis na concentração de 40 mg/mL e o pH foi ajustado para 7,2.

Para os experimentos de imunização e desafio foi utilizado um total de 30 camundongos Balb/c, fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade, divididos em 5 grupos de 6 animais. A condução do experimento foi aprovada pela comissão de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA/UFPel) sob o número 2422. Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos: G1, controle negativo, inoculado com 5 mg de EEP; G2, inoculado com a proteína rCP40 associada a saponina (7,5 µg); G3, inoculado com a proteína rCP40 associada a 1mg de EEP; G4, inoculado com a proteína rCP40 associada a 5 mg de EEP; G5, controle positivo, inoculado com 100 µL de bacterina, via i.p., produzida a partir da inativação pelo calor do cultivo contendo  $10^6$  UFC da cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*. Os grupos G1 a G4 foram inoculados com um volume final de 300 µL, por via s.c. A proteína rCP40 foi utilizada na quantidade de 50 µg/dose. Os animais foram imunizados com 2 doses da vacina com intervalo de 21 dias. O desafio foi realizado 21 dias após a última imunização com 1 mL contendo  $10^5$  UFC da cepa MIC-6 por via i.p. Após a realização do desafio, os animais foram acompanhados durante 30 dias.

Para a análise estatística, o teste exato de Fisher e o teste log-rank foram usados para determinar diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na mortalidade e taxa de sobrevivência, respectivamente, entre os grupos experimentais.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identidade da proteína recombinante rCP40 foi confirmada por meio de um *Western Blotting* com anticorpo monoclonal anti-6XHis, gerando uma banda com tamanho de 40 kDa (Figura 1).



**Figura 1.** *Western Blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti- 6Xhis Tag (Sigma) (1) Marcador Molecular (PageRuler™, Thermo Scientific), (2) Proteína

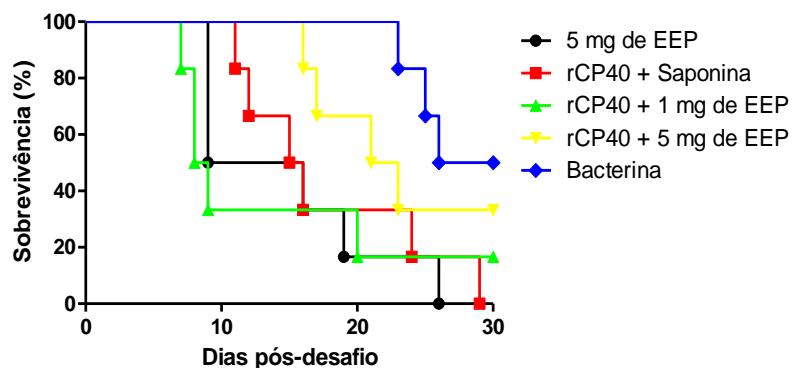
recombinante purificada CP40. A banda reativa demonstra a identidade da rCP40 no tamanho de aproximadamente 40 kDa.

Ao final dos 30 dias de observação, não foi constatada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) dos grupos experimentais em relação ao controle negativo para a sobrevivência ou tempo de sobrevida. No entanto, nos grupos em que houve associação do EEP com a proteína rCP40, observou-se um nível de proteção crescente, demonstrando uma relação dose-dependente para o uso do EEP. Assim, a associação de rCP40 com 5 mg de EEP resultou em uma taxa de proteção de 33,3%, enquanto que na associação com apenas 1 mg de EEP, essa taxa caiu para 16,6% (Figura 2).

Entretanto, vale ressaltar que no grupo da bacterina (controle positivo), observou-se uma taxa de proteção de apenas 50%. Esses resultados podem indicar uma dose-desafio muito alta, uma vez que houve uma elevada mortalidade no referido grupo.

SILVA et. al., (2014) demonstraram níveis de proteção de até 90%, quando associaram a proteína rCP40 com a saponina, entretanto, esses autores realizaram o desafio com uma dose de  $10^4$  UFC da cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*. No presente estudo, um grupo controle foi utilizado associando a proteína rCP40 com a saponina, e, em nosso estudo, todos os animais haviam morrido no 29º dia pós-desafio.

Deste modo, novos estudos deverão ser realizados aplicando-se uma dose-desafio menor, visando-se obter resultados mais consistentes em relação aos grupos controles, e, consequentemente maiores taxas de proteção nos grupos vacinais.



**Figura 2.** Curva de sobrevivência demonstrando os níveis de proteção imunológica do extrato etanólico de própolis vermelha associado à proteína recombinante rCP40 de *C. pseudotuberculosis* após o desafio (EEP = Extrato etanólico de própolis vermelha brasileira).

#### 4. CONCLUSÕES

O EEP apresentou efeito adjuvante potencial de forma dose-dependente quando associada com a proteína rCP40 de *C. pseudotuberculosis*. Seu uso na dose de 5 mg foi capaz de promover níveis mais elevados de proteção (33,3%), e, assim, essa dose foi considerada mais adequada para uso em vacinas recombinantes de subunidade.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S. M. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v.32, n.6, p.1523-1527, 2009.

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.

RESENDE, F.C.B.; PASSOLD, J.; FERREIRA, S.I.A.C.; ZANETTI, C.R.; LIMA, H. C. Adjuvantes de vacinas: possibilidades de uso em seres humanos ou animais. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v.27, n.3, p.116-124, 2004.

SOUZA, M.F.; CARVALHO,A.Q.; GARINO JR, F.; RIET-CORREA, F. Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.3, p.224-230, 2011.

SILVA, J. W., DROPPA-ALMEIDA, D., BORSUK, S., AZEVEDO, V., PORTELA, R. W., MIYOSHI, A., ROCHA, F. S., DORELLA, F. A., VIVAS, W. L., PADILHA, F. F., HERNÁNDEZ-MACEDO, M. L., LIMA-VERDE, I. B. *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40 recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis. **BMC Veterinary Research**, v.10, p.965, 2014.