

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

KARINA PEREIRA LUDUVICO¹; MARA THAIS DE OLIVEIRA SILVA², KAREN SILVA LEAL²; ANDRÉA DE FÁTIMA SILVA REZENDE²; FRANCISCO SILVESTRE BRILHANTE BEZERRA²; SIBELE BORSUK³

¹Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas – karina-ldvc@hotmail.com

²Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas – marathaisos@gmail.com, karensleal@hotmail.com, andreabiomedica@hotmail.com, silvestrebrilhante@gmail.com

³Centro de Desenvolvimento Tecnológico – sibeleborsuk@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, sonificado 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 NaH₂PO₄; 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°28'25" e W 36°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 10⁶ 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 10⁵ 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).

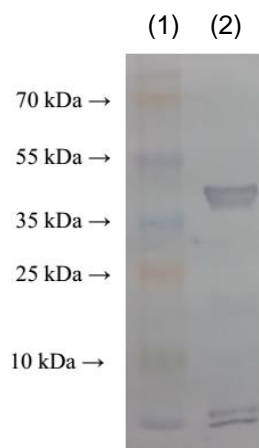


Figura 1. *Western Blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti- 6Xhis Tag (Sigma) (1) Marcador Molecular (PageRuler™, Thermo Scientific), (2) Proteína

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.

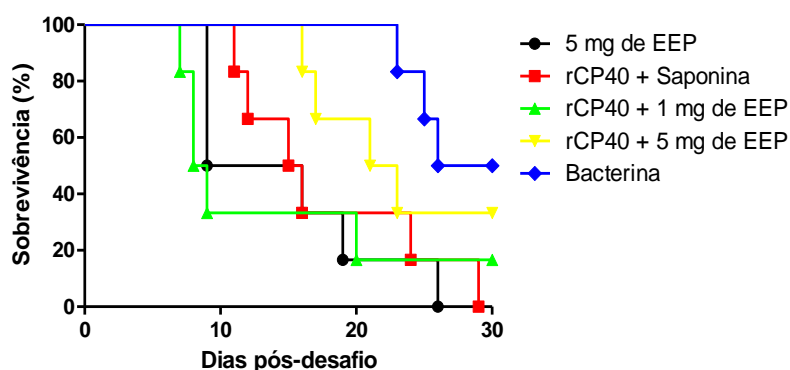


Figura 2. Curva de sobrevivência demonstrando os níveis de proteção imunológica do extrato etanólico de própolis vermelha associado à proteína recombinante rCP40 de *C. pseudotuberculosis* após o desafio (EEP = Extrato etanólico de própolis vermelha brasileira).

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.