

## AVALIAÇÃO DA FOSFOESTERASE RECOMBINANTE rCP0369 DE *C. pseudotuberculosis* EM FORMULAÇÃO VACINAL CONTENDO SAPONINA CONTRA A LINFADENITE CASEOSA

**FRANCISCO SILVESTRE BRILHANTE BEZERRA<sup>1</sup>; MARA THAIS DE OLIVEIRA SILVA<sup>1</sup>; ANDRÉA DE FÁTIMA SILVA REZENDE<sup>1</sup>; KAREN SILVA LEAL<sup>1</sup>; FERNANDA KEGLES<sup>2</sup>; SIBELE BORSUK<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas – [silvestrebrilhante@gmail.com](mailto:silvestrebrilhante@gmail.com), [marathaisos@gmail.com](mailto:marathaisos@gmail.com), [andreaobiomedica@hotmail.com](mailto:andreaobiomedica@hotmail.com), [karensleal@hotmail.com](mailto:karensleal@hotmail.com)

<sup>2</sup>Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas – [fkegles@hotmail.com](mailto:fkegles@hotmail.com)

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

### 1. INTRODUÇÃO

Apesar das diversas tentativas em se desenvolver uma formulação vacinal que seja eficaz e segura contra a linfadenite caseosa (LC), não há ainda no mercado uma vacina para esta enfermidade com essas características (GUIMARÃES et al., 2011). As vacinas disponíveis possuem um nível muito variável de proteção contra a infecção natural, além de efeitos adversos como formação de abscesso no local da inoculação (DORELLA et al., 2009).

Nesse sentido, vários trabalhos têm sido conduzidos na tentativa de buscar novos alvos vacinais no genoma de *C. pseudotuberculosis* que induzam maiores níveis de proteção. Um estudo de pan-exoproteoma *in silico* revelou vários alvos vacinais com potencial para o desenvolvimento de vacinas contra a LC, e, dentre estes, está o gene *cp1002\_0369*, que codifica para uma provável fosfoesterase secretada (SANTOS et al., 2012). A proteína recombinante rCP0369 já foi expressa e usada em vacinas de subunidade recombinante com os adjuvantes hidroxido de alumínio e xantana por nosso grupo, onde foi confirmada a imunogenicidade da proteína pela elevação dos níveis de IgG total nos camundongos imunizados, porém foi incapaz de conferir proteção no desafio contra a cepa MIC-6 de *C. pseudotuberculosis* (REZENDE et al., 2013).

Apesar da escolha do antígeno ser uma etapa importante, também é fundamental que o adjuvante seja apropriadamente selecionado, já que, muitas vezes, um mesmo antígeno usado em formulações contendo adjuvantes diferentes pode resultar em diferentes níveis de proteção (REED et al., 2009). Bastos et al., (2013) sugeriram que a saponina poderia ser um adjuvante promissor a ser usado em vacinas para a LC, uma vez que em diferentes formulações veterinárias ela foi capaz de estimular respostas Th1 e produção de linfócitos T citotóxicos (SUN et al., 2009). Em recente estudo, SILVA et al., (2014) obtiveram níveis de proteção de até 90% contra a LC quando associaram a proteína recombinante CP40 à saponina.

Assim, neste trabalho, objetivou-se avaliar a formulação vacinal contendo a proteína recombinante rCP0369 associada à saponina quanto à resposta imune humoral induzida e ao nível de proteção contra a LC.

### 2. METODOLOGIA

A proteína proteína recombinante rCP0369 foi expressa na cepa DE3 BL21 Star de *Escherichia coli*, conforme protocolo de REZENDE et al., (2013). Para os

experimentos de imunização e desafio foi utilizado um total de 18 camundongos Balb/c, fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade, divididos em 3 grupos de 6 animais. A condução do experimento foi aprovada pela comissão de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA/UFPel nº 2422). Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos: G1, como controle negativo, inoculado com 7,5 µg de saponina em uma dose final de 300 µL, via s.c.; G2, como grupo experimental, inoculado com 7,5 µg de saponina associado a 50 µg de rCP0369, em dose final de 300 µL, via s.c.; G3, como controle positivo, inoculado com 100 µL de bacterina, via i.p., produzida a partir da inativação do cultivo contendo  $10^6$  UFC da cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*. 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 de *C. pseudotuberculosis* por via i.p. Após a realização do desafio, os animais foram acompanhados durante 40 dias.

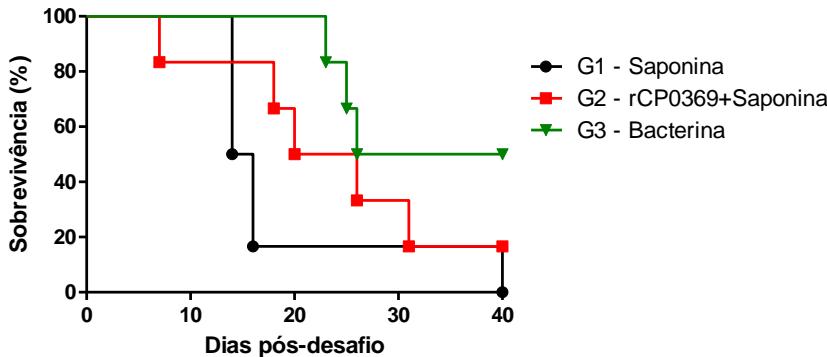
As coletas de sangue foram realizadas nos dias 0, 21 e 42 do experimento. Ensaios de ELISA indireto foram realizados para a verificar a indução da resposta imune humoral, por meio da mensuração dos níveis de IgG total e também dos isótipos IgG1 e IgG2a. As placas foram sensibilizadas com 0,5 µg/cavidade da proteína recombinante rCP0369, e o ensaio conduzido de acordo com a metodologia descrita por SILVA et al. (2014).

As análises estatísticas dos ensaios de ELISA foram feitas usando o software GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad Software, USA). Diferenças entre a produção de IgG nos diferentes grupos foram calculadas pelo one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0.05$ . Para determinar diferenças significativas na mortalidade e taxa de sobrevivência entre os grupos experimentais, foram usados o teste exato de Fisher e o teste log-rank, respectivamente.

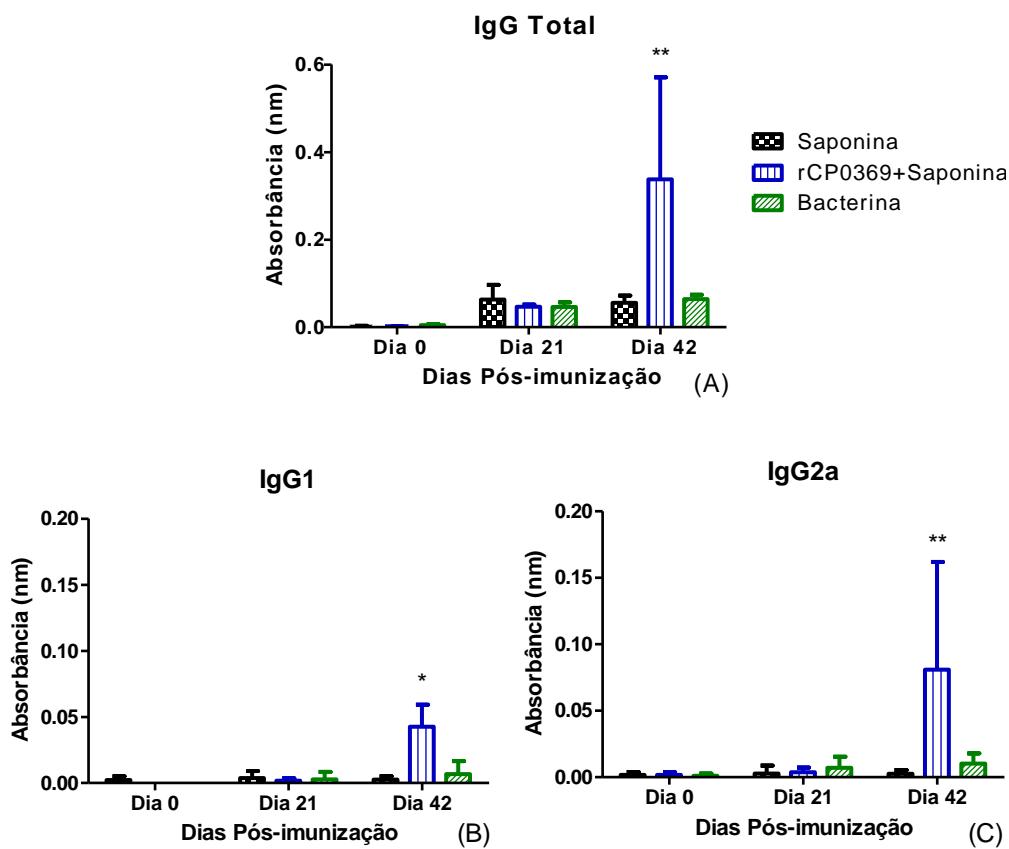
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A vacina contendo rCP0369 associada à saponina não foi capaz de induzir níveis significativos de proteção ( $p > 0.05$ ), porém um índice de 16,6% de proteção foi obtido (Figura 1). É importante observar que os animais do G3, controle positivo apresentaram apenas 50% de sobrevivência, o que pode indicar uma dose desafio muito alta. 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, a dose utilizada foi de  $10^5$  UFC da mesma cepa.

Em relação aos níveis de IgG total, foram observados níveis significativamente mais altos que os demais grupos no dia 42 (Figura 2.A). Já os isótipos IgG1 e IgG2a também apresentaram níveis mais elevados no dia 42 (Figura 2.B e 2.C), com valores um pouco mais altos de IgG2a, o que pode indicar um perfil do tipo Th1, responsável por ativação de macrófagos e linfócitos T CD8<sup>+</sup>, e, assim, mais relacionado à uma ativação da imunidade celular contra patógenos intracelulares (Alberts et al., 2007). De fato, esse perfil já foi associado à proteção e aumento da resposta imune contra *C. pseudotuberculosis* em ovinos (EL-ENBAAWY et al., 2005).



**Figura 1.** Curva de sobrevivência demonstrando os níveis de proteção imunológica da formulação contendo proteína recombinante rCP0369 de *C. pseudotuberculosis* após o desafio com a cepa virulenta MIC-6.



**Figura 2.** Avaliação dos níveis de IgG total (A), IgG1 (B) e IgG2a (C) específicas em camundongos imunizados com rCP0369 associada ao adjuvante saponina. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão (barras) das absorbâncias (nm) encontradas no ensaio de ELISA indireto para cada grupo experimental. O sangue foi coletado e avaliado nos dias 0, 21 e 42 do experimento.  
 \*Resultado significativamente superior ( $p < 0,05$ ) ao controle negativo (saponina).  
 \*\*Resultado significativamente superior ( $p < 0,05$ ) aos demais grupos.

#### 4. CONCLUSÕES

Apesar dos baixos índices de proteção (16,6%), a associação da rCP0369 com saponina induziu níveis elevados de anticorpos, especialmente de IgG2a,

associado à um fenótipo de resposta protetiva Th1. Repetições deste experimento com doses desafio mais adequadas devem ser realizadas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. New York: Garland Science; 2007.

BASTOS, B.L.; LOUREIRO, D.; RAYNAL, J.T.; GUEDES, M.T.; VALE, V.L.C.; MOURA-COSTA, L.F.; GUIMARÃES, J.E., AZEVEDO, V., PORTELA, R.W.; MEYER, R. Association between haptoglobin and IgM levels and the clinical progression of caseous lymphadenitis in sheep. **BMC veterinary research**, v.9, n.1, p. 254, 2013.

DORELLA, F.A.; PACHECO, L.G.C.; SEYFFERT, N.; PORTELA, R.W.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. **Expert Reviews of Vaccine**, v.8, n.2, p.205-313, 2009.

EL-ENBAAWY, M.I.; SAAD, M.M.; SELIM, S.A. Humoral and cellular immune responses of a murine model against *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Egyptian Journal of Immunology**, v.12, p.13-20, 2005.

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.

REED, S.G.; BERTHOLET, S.; COLER, R.N.; FRIEDE, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends in immunology**, v.30, n.1, p. 23–32, 2009.

REZENDE, A.F.S.; LEAL, K.S.; BRUM, A.A.; RODRIGUES, A.P.; REIS, C.G.R.; BORSUK. Avaliação de vacinas de subunidade recombinante utilizando a rCP0369 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para a linfadenite caseosa. In: **ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFPel**, XV, Pelotas, 2013. **Anais...** Pelotas, Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, 2013, v.15.

SANTOS, A.R., CARNEIRO, A., GALA-GARCIA, A., PINTO, A., BARH, D., BARBOSA, E., ABURJAILE, F., DORELLA, F., ROCHA, F., GUIMARAES, L., ZURITA-TURK, M., RAMOS, R., ALMEIDA, S., SOARES, S., PEREIRA, U., ABREU, V.C., SILVA, A., MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. The *Corynebacterium pseudotuberculosis* in silico predicted pan-exoproteome. **BMC Genomics**, v.13 Suppl 5, S6, 2012.

SUN, H.X.; XIE, Y.; YE, Y.P. Advances in saponin-based adjuvants. **Vaccine**, v.27, p.1787-1796, 2009.