

## ASSOCIAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* EM VACINA RECOMBINANTE DE SUBUNIDADE PARA LINFADENITE CASEOSA

MARA THAIS DE OLIVEIRA SILVA<sup>1</sup>; FRANCISCO SILVESTRE BRILHANTE BEZERRA<sup>1</sup>; RAQUEL NASCIMENTO DAS NEVES<sup>2</sup>; RODRIGO BARROS DE PINHO<sup>2</sup>; MARINA CARDOSO DE FREITAS<sup>2</sup>; SIBELE BORSUK<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – [raquelnieves@hotmail.com](mailto:raquelnieves@hotmail.com), [rodrigobpinho@hotmail.com](mailto:rodrigobpinho@hotmail.com), [marinacardosodfreitas@gmail.com](mailto:marinacardosodfreitas@gmail.com)

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

### 1. INTRODUÇÃO

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é uma bactéria Gram-positiva e intracelular facultativa responsável pela etiologia da linfadenite caseosa (LC). A LC consiste em uma infecção debilitante crônica que afeta principalmente rebanhos de pequenos ruminantes em todo o mundo, gerando perdas econômicas significativas (BASTOS et al., 2012).

Um dos principais fatores de virulência do *C. pseudotuberculosis* é a fosfolipase D (PLD), uma potente exotoxina que atua como fator de permeabilidade, contribuindo para a disseminação das bactérias a partir do local inicial da infecção (DORELLA et al., 2006). A participação da PLD na patogênese da LC foi demonstrada por HODGSON et al. (1992), que desenvolveram uma bactéria PLD-negativa, e a utilizaram na vacinação de ovinos. *C. pseudotuberculosis* PLD-negativo demonstrou dificuldade em permanecer no hospedeiro e elicitou baixos níveis de resposta humoral e celular em comparação à cepa selvagem.

Até o momento, nenhum modelo vacinal satisfatório para a LC foi desenvolvido, e, alguns autores consideram as vacinas recombinantes de subunidade como estratégias promissoras, uma vez que são mais seguras por serem formuladas com base em antígenos purificados (LILJEQVIST & STAHL, 1999; BASTOS et al., 2012). O sucesso deste tipo de vacina está intimamente relacionado à seleção dos alvos vacinais (DROPPA-ALMEIDA ET AL., 2016). Neste contexto, destacam-se a utilização de ferramentas de bioinformática e as análises de genômica comparativa e proteômica na predição de novos alvos (RUIZ et al., 2011).

Recentemente, utilizando uma estratégia computacional denominada MED (Densidade de Epítomos Maduros), a proteína rCP09720 (antiga rCP1957) foi ranqueada como o segundo alvo mais promissor para utilização em diagnósticos e vacinas entre 2.097 proteínas candidatas. Esta proteína demonstrou excelentes níveis de sensibilidade e especificidade em ensaios imunoenzimáticos para diagnóstico da LC (REZENDE et al., 2016).

Uma vez que a associação de antígenos recombinantes em uma mesma formulação vacinal pode elevar os níveis de proteção, este trabalho tem por objetivo avaliar a eficácia da associação das proteínas recombinantes rPLD e rCP09720 na indução da produção de IgG e de proteção contra o desafio com *C. pseudotuberculosis* em modelo murino.

## 2. METODOLOGIA

A expressão das proteínas recombinantes rPLD e rCP09720 na cepa DE3 BL21 Star de *Escherichia coli* foi realizada conforme protocolo previamente descrito por REZENDE et al., 2016.

Para os experimentos de imunização e desafio foi utilizado um total de 40 camundongos Balb/c, fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade, alocados em 4 grupos de 10 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 solução salina 0,9% via s.c.; G2, inoculado com 50 µg da proteína rPLD associada a saponina (7,5 µg) via s.c.; G3, inoculado com as proteínas rPLD e rCP09720 (25 µg de cada) associadas a saponina (7,5 µg) via s.c.; e G4, como controle positivo, inoculado com 100 µL de bactéria, 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 G3 foram inoculados com um volume final de 300 µL. Os animais foram imunizados com 2 doses da vacina intervaladas por 21 dias. O desafio foi realizado 21 dias após a última imunização com  $10^4$  UFC da cepa MIC-6 por via i.p. Após a realização do desafio, os animais foram acompanhados durante 30 dias.

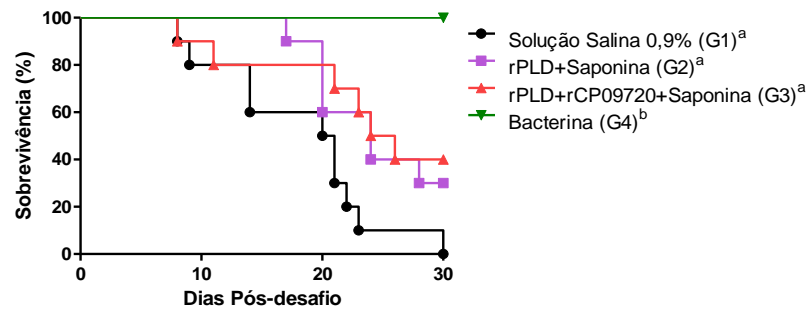
Coletas de sangue foram realizadas nos dias 0, 21 e 42 do experimento. Ensaio de ELISA indireto foram realizados para verificar a indução da resposta imune humoral, por meio da mensuração dos níveis de IgG total de acordo com a metodologia descrita por SILVA et al., 2014.

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

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

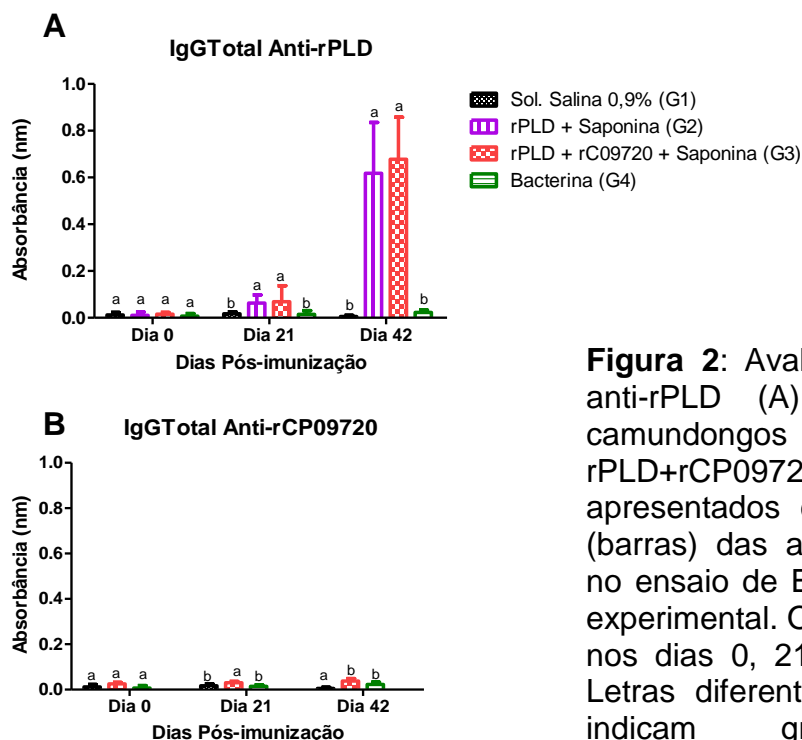
Após 30 dias de experimento, todos os animais do controle negativo (G1) vieram a óbito, enquanto o controle positivo (G4) obteve 100% de proteção. As vacinas contendo a proteína rPLD de forma individual (G2) ou associada à proteína rCP09720 (G3) não foram capazes de elicitar níveis significativos de proteção ( $p < 0,05$ ). Apesar disto, observou-se um acréscimo de 10% no nível de proteção quando os grupos G2 e G3 foram comparados (Figura 1). Desta forma, observou-se um efeito biológico positivo quando a proteína rPLD foi associada à proteína rCP09720.

Da mesma forma, WILHELM et al. (2006) reportaram que a associação das proteínas recombinantes Hsp60, Hsp70 e FlgG de *Piscirickettsia salmonis* em uma vacina contra a *Piscirickettsiosis* eliciu níveis satisfatórios de proteção contra o agente patogênico, que apresentou concordância com os níveis de resposta humoral obtidos em cada formulação.



**Figura 1:** Curva de sobrevivência obtida no ensaio de imunização dos camundongos com as diferentes formulações vacinais após desafio com cepa virulenta MIC-6 ( $10^4$  UFC) de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Em relação aos níveis de IgG total, os maiores níveis de IgG anti-rPLD foram obtidos no dia 42 (Figura 2A). Ainda, os grupos G2 e G3 foram capazes de induzir níveis de produção de IgG anti-rPLD estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) nos dias 21 e 42. Por outro lado, a produção de IgG anti-rCP09720 (Figura 2B) foi consideravelmente menor nesses mesmos dias, o que aponta para uma resposta imune humoral preferencial em relação à proteína rPLD. No entanto, observa-se que houve uma pequena elevação dos níveis de IgG anti-rCP09720, embora sem diferença significativa, para o grupo G3, o que pode ter contribuído para uma maior taxa de proteção de 40% obtida pelo grupo (G3) em relação aos 30% de proteção obtidos pela inoculação apenas da rPLD (G2).



**Figura 2:** Avaliação dos níveis de IgG total anti-rPLD (A) e anti-rCP09720 (B) em camundongos imunizados com rPLD e rPLD+rCP09720. 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 após a 1ª imunização. Letras diferentes dentro de um mesmo dia indicam grupos com resultados significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

#### 4. CONCLUSÕES

A associação de rCP09720 à proteína rPLD demonstrou-se benéfica, uma vez que foi capaz de promover uma elevação da taxa de proteção em 10%

quando compara à utilização de apenas rPLD em formulações vacinais contra a linfadenite caseosa, ainda que diferenças estatísticas não tenham sido observadas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASTOS, B.L., WAGNER, R., PORTELA, D., DORELLA, F.A., RIBEIRO, D., SEYFFERT, N. & PAULA, T.L. DE. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. **Immunol, J Clin Cell**, v. S4, n.005, p. 1–15, 2012.
- DORELLA, F.A., PACHECO, L.G.C., OLIVEIRA, S.C., MIYOSHI, A. & AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary research**, v. 37, n. 2, p. 201–18, 2006.
- DROPPA-ALMEIDA, D., VIVAS, W.L.P., KELLY, K., SILVA, O., REZENDE, A.F.S., SIMIONATTO, S., MEYER, R., LIMA-VERDE, I.B., DELAGOSTIN, O., BORSUK, S. & PADILHA, F.F. Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. **Vaccine**, v. 34, p. 1091–1096, 2016.
- HODGSON, A. L.M., KRYWULT, J., CORNER, L. A., ROTHEL, J.S. & RADFORD, A. J. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 7, p. 2900–2905, 1992.
- LILJEQVIST, S. & STAHL, S. Production of recombinant subunit vaccines : protein immunogens , live delivery systems and nucleic acid vaccines. **Journal of Biotechnology**, v. 73, p. 1–33, 1999.
- REZENDE, A. DE F.S., BRUM, A.A., REIS, C.G., ANGELO, H.R., LEAL, K.S., SILVA, M.T. DE O., SIMIONATTO, S., AZEVEDO, V., SANTOS, A., PORTELA, R.W., DELLAGOSTIN, O. & BORSUK, S. In silico identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigenic targets and application in immunodiagnosis. **Journal of Medical Microbiology**, 2016.
- RUIZ ET AL. Evidence for Reductive Genome Evolution and Lateral Acquisition of Virulence Functions in Two *Corynebacterium pseudotuberculosis* Strains. **PLoS one**, v.6, n.4, 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, n. 1, p. 1–8, 2014.
- WILHELM, V., MIQUEL, A., BURZIO, L.O., ROSEMBLATT, M., ENGEL, E., PARADA, G. & VALENZUELA, P.D.T. A vaccine against the salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis* based on recombinant proteins. **Vaccine**, v. 24, p. 5083–5091, 2006.