

ASSOCIAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES rPLD E rCP01850 NO DESENVOLVIMENTO DE VACINA PARA LINFADENITE CASEOSA

**RODRIGO BARROS DE PINHO¹; RAQUEL NASCIMENTO DAS NEVES¹,
MARINA CARDOSO DE FREITAS¹, MARA THAIS DE OLIVEIRA SILVA²,
FRANCISCO SILVESTRE BRILHANTE BEZERRA², SIBELE BORSUK³.**

¹Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas – rodrigobpinho@hotmail.com,
raquelneeves@hotmail.com, marinacardosodfreitas@gmail.com;

²Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas –
marathaisos@gmail.com; silvestrebrilhante@gmail.com;

³Centro de Desenvolvimento Tecnológico – sibeleborsuk@gmail.com;

1. INTRODUÇÃO

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença crônica que afeta ovinos e caprinos no mundo todo, caracterizada pela formação de abscessos em gânglios linfáticos superficiais e viscerais (RIBEIRO *et al.*, 2014; DORELLA *et al.*, 2009). *Corynebacterium pseudotuberculosis*, seu agente causador, é uma bactéria Gram-positiva e intracelular celular facultativa refratária ao tratamento com antibióticos devido a formações de biofilmes protetores na infecção natural (DORELLA *et al.*, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2011).

Dante de métodos de tratamento ineficazes e onerosos, atualmente a melhor estratégia para controle e prevenção da LC é a vacinação (PATON *et al.* 2003). Entretanto, as vacinas comerciais disponíveis para a linfadenite caseosa apresentam limitações como baixa eficácia e reações adversas (DORELLA *et al.*, 2009). Deste modo, é constante a busca por novos alvos e formulações vacinais, onde vacinas polivalentes utilizando a associação de proteínas recombinantes são uma estratégia promissora.

A fosfolipase D (PLD) é um dos principais fatores de virulência descritos de *C. pseudotuberculosis*, uma vez que atua como um fator de permeabilidade e contribui para a propagação da infecção, sua enzima catalisa a dissociação da esfingomielina e possibilita o aumento da permeabilidade vascular, permitindo a multiplicação e sobrevivência do patógeno nas células (HODGSON *et al.*, 1999; BAIRD & FONTAINE, 2007). A mesma quando geneticamente inativada promoveu uma proteção de 44% em ovinos desafiados com *C. pseudotuberculosis* (HODGSON *et al.* 1999).

Outro alvo em potencial para o desenvolvimento de vacinas é a rCP01850 (antiga rCP0369), uma fosfatase ácida de 410 aminoácidos (NCBI) ranqueada pela análise MED (Densidade de Epítopos Maduros) como terceiro alvo mais promissor para uso em diagnóstico e vacinas (REZENDE *et al.* 2016). Esta análise baseia-se no ranqueamento de proteínas de acordo com o número de epítopos presentes na proteína madura capazes de se ligar ao MHC I (SANTOS *et al.* 2013). rCP01850 obteve os melhores valores de sensibilidade e especificidade quando utilizada em imunodiagnóstico (REZENDE *et al.* 2016).

Uma vez que a associação de抗ígenos recombinantes aumenta os níveis de resposta imune e que alvos utilizados em imunodiagnósticos são geralmente bons alvos vacinais, este estudo tem como objetivo avaliar o potencial da formulação contendo a proteína recombinante CP01850 em associação com rPLD em vacina recombinante de subunidade.

2. METODOLOGIA

Para a expressão das proteínas recombinantes utilizou-se os plasmídeos pAE/pld e pAE/01850 previamente construídos. Estes plasmídeos foram transformados por choque térmico em *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star, e a expressão das proteínas foi induzida com 1 mM de IPTG por 3 h a 37°C em agitador orbital. Para a purificação das proteínas recombinantes, 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 segundos (20 KHz). Após uma centrifugação a 7000 rpm por 15 minutos 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). As proteínas recombinantes foram purificadas utilizando a coluna de cromatografia por afinidade HisTrap™ HP (GE Healthcare). Em seguida procedeu-se à diálise em tampão Tris 100 mM-NaCl 300mM. Para avaliação da identidade das proteínas, foi realizado um Western Blotting utilizando anticorpo monoclonal anti-6XHis (Sigma Aldrich).

Para os experimentos de imunização foi utilizado um total de 40 camundongos Balb/c, fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade, divididos 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 2442. Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos: G1, inoculado com 300 µl de solução salina 0,9%, via s.c; G2, inoculado com 50 µg de rPLD + 7,5 µg de saponina, via s.c; G3, inoculado com 50 µg de proteína recombinante (25 µg de rPLD + 25 µg rCP01850) + 7,5 µg de saponina, via s.c; e G4, inoculado com 100 µl de bacterina da cepa MIC-6 de *C. pseudotuberculosis* (10⁶ UFC), via i.p. Os grupos G2 e G3 foram inoculados com um volume final de 300 µL por dose de vacina.

As coletas de sangue foram realizadas nos dias 0, 21 e 42 do experimento. ELISA indireto foi realizado para avaliar os níveis IgG total nos diferentes grupos imunizados. O desafio foi realizado com a cepa MIC-6 (10⁴ UFC) de *C. pseudotuberculosis*, 21 dias após a última imunização e os animais foram observados por 30 dias.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad Software, USA). Teste exato de Fisher e o teste log-rank foram aplicados para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$) na mortalidade e taxa de sobrevivência, respectivamente, entre os grupos experimentais e controles. Diferenças entre a produção de IgG total nos diferentes grupos foram calculadas pelo one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A vacina contendo rPLD induziu 30% de proteção em camundongos, no entanto não foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$). Acordando como descrito por FONTAINE *et al.* (2006), onde formulada individualmente, a rPLD não foi capaz de proteger completamente a LC em ovinos, porém, se mostrou uma via importante de disseminação, impedindo manifestações específicas da doença. Já quando a rPLD foi associada à rCP01850 (G3), foi possível observar uma taxa de

proteção mais elevada, de 50%, estatisticamente significativa em relação ao controle negativo (G1) (Figura 1).

Em relação aos níveis de IgG total, em G2 e G3 índices de produção de anticorpos anti-rPLD e anti-rCP01850 aumentaram significativamente no dia 42. No ELISA anti-rPLD foi possível observar níveis significativamente maiores no grupo G2 nos dias 21 e 42, enquanto em G3, os níveis se mostraram significativamente maiores no dia 21 apenas em comparação ao grupo controle negativo (G1) (Figura 2A). No caso dos níveis de IgG total anti-rCP01850, os índices em G3 se mostraram estatisticamente maiores aos demais grupos controles tanto no dia 21, quanto no dia 42 (Figura 2B).

Podemos notar uma relação entre os níveis de proteção e a resposta humoral, uma vez que em G3 (50% de proteção) houve a maior indução de anticorpos anti-rCP01850 em associação a uma produção considerável anti-rPLD, enquanto que G4 (proteção de 30%) elicitou apenas a produção de anticorpos anti-rPLD, reafirmando a vantagem desta associação.

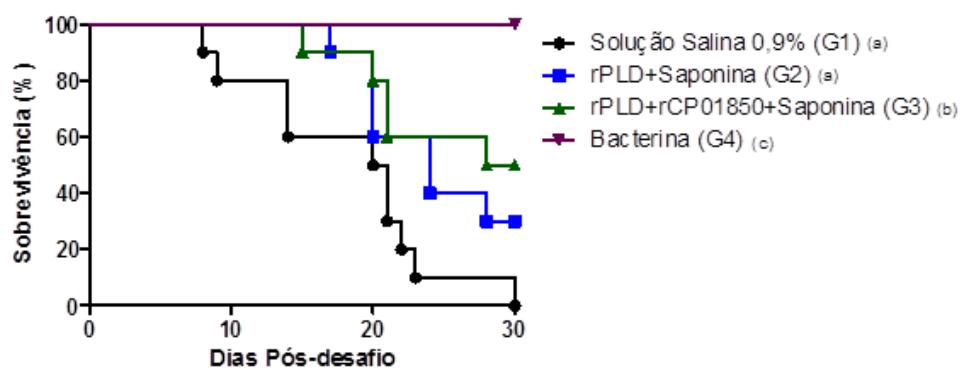


Figura 1: Curva de sobrevida obtida no ensaio de imunização dos camundongos com as diferentes formulações vacinais após desafio com cepa virulenta MIC-6 (10^4 UFC) de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

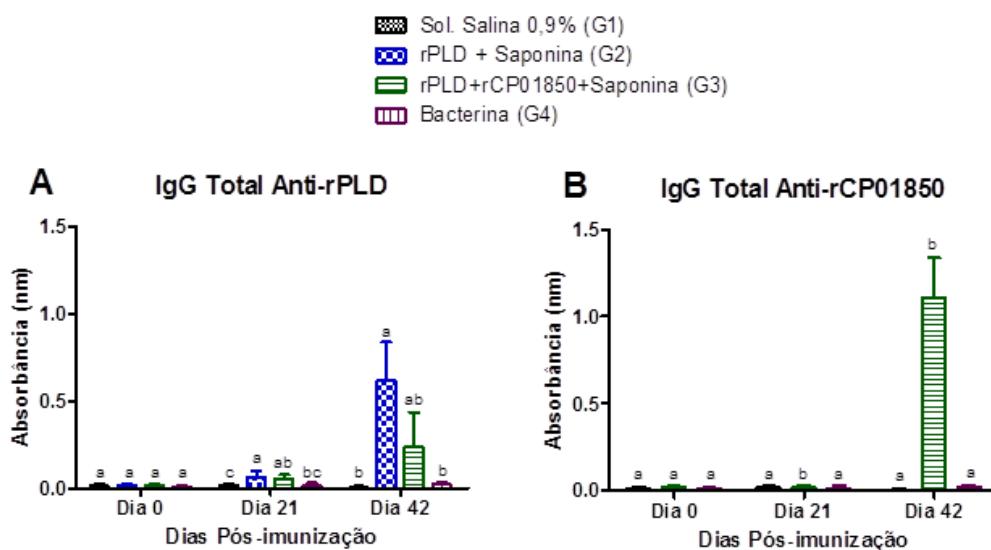


Figura 2: Avaliação dos níveis de IgG total anti-rPLD (A) e anti-rCP01850 (B) em camundongos imunizados com rPLD e rPLD+rCP01850 em associação ao adjuvante saponina. Os resultados estão apresentados como média e desvio

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 após a 1^a imunização. Letras diferentes dentro de um mesmo dia indicam grupos com resultados significativamente diferentes ($p<0,05$).

4. CONCLUSÕES

A vacina formulada pela associação das proteínas rPLD e rCP01850 apresentou-se promissora, uma vez que alcançou melhores taxas de proteção contra o desafio com *C. pseudotuberculosis* em comparação a formulação composta apenas por rPLD e adjuvante saponina. Esta formulação também foi responsável por estimular altos níveis de produção de anticorpos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *Journal of comparative pathology*, v. 137, n. 4, p. 179-210, 2007.
- DORELLA, F.A.D., Gustavo, L., Acheoco, C.P., Liveirab, S.C.O., Iyoshia, A.M. & Zevedoa, V.A. (2006). ***Corynebacterium pseudotuberculosis : microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence.*** 37. p. 201–218.
- DORELLA, F.A.D., Pacheco, L.G.C., Seyffert, N., Portela, R.W., Meyer, R., Miyoshi, A. & Azevedo, V. (2009). Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. ***Expert Review of Vaccines.*** 8(2). p. 205–209.
- Fontaine, M. C., Baird, G., Connor, K. M., Rudge, K., Sales, J., & Donachie, W. (2006). Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. ***Vaccine***, 24(33), 5986-5996.
- HODGSON, Adrian LM et al. Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. ***Vaccine***, v. 17, n. 7, p. 802-808, 1999.
- PATON, M.W., Walker, S.B., Rose, I.R. & Watt, G.F. (2003). Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. ***Australian Veterinary Journal***. 81(1-2). p. 92–95.
- REZENDE, A. D. F. S., Brum, A. A., Reis, C. G., Angelo, H. R., Leal, K. S., de Oliveira Silva, M. T., ... & Dellagostin, O. (2016). In silico identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigenic targets and application in immunodiagnosis. ***Journal of medical microbiology***.
- RIBEIRO, D., Rocha, F.D.S., Leite, K.M.C., Soares, S.D.C., Silva, A., Portela, R.W.D., Meyer, R., Miyoshi, A., Oliveira, S.C., Azevedo, V. & Dorella, F.A. (2014). An iron-acquisition-deficient mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis* efficiently protects mice against challenge. ***Veterinary research***. 45(1). p. 28.