

RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL INDUZIDA EM CAMUNDONGOS APÓS VACINAÇÃO COM A PROTEÍNA RECOMBINANTE CP09720 DE *Corynebacterium pseudotuberculosis*

BÁRBARA DA ROCHA FONSECA¹; LUIZA DOMINGUES MORON¹, NICOLE
RAMOS SCHOLL¹, RODRIGO BARROS DE PINHO², RAQUEL NASCIMENTO
DAS NEVES²; SIBELE BORSUK³

¹Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas – barbфонсека@hotmail.com;
luizabiotec99@gmail.com; nicoleramosscholl@hotmail.com

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – rodrigobpinho@hotmail.com;
raquelneeves@hotmail.com

³Centro de Desenvolvimento Tecnológico - CDTec – sibeleborsuk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria Gram positiva, intracelular facultativa e pertencente ao grupo dos actinomicetos (D'AFONSECA et al., 2010). É o agente etiológico da linfadenite caseosa (LC), doença infectocontagiosa de incidência mundial que acomete pequenos ruminantes, como ovelhas e cabras. Essa doença se caracteriza pelo desenvolvimento de abscessos nos ganglios linfáticos e órgãos internos, como baço, fígado, pulmão e útero (FONTAINE et al. 2006), ocasionando significativas perdas econômicas (DORELLA et al. 2009).

A melhor alternativa preventiva para essa doença é a vacinação, visto que uma espessa camada de tecido conjuntivo se forma ao redor dos abscessos, impedindo a ação de antibióticos (RIBEIRO et al. 2014). Algumas vacinas comerciais já se encontram disponíveis no mercado, no entanto, apresentam baixa eficácia, reações adversas e diferentes níveis de proteção nas diferentes espécies (SEYFFERT et al. 2010), aumentando a necessidade de busca por novos alvos e formulações vacinais como vacina para LC.

Recentemente, a proteína CP09720 apresentou bons níveis de sensibilidade e especificidade em ensaios imunoenzimáticos para diagnóstico de LC e foi apontada, através de análises computacionais, como promissor alvo vacinal para essa doença (REZENDE et al. 2016).

A partir disso, o objetivo do presente trabalho busca avaliar os níveis de resposta imune celular e humoral induzida em camundongos após vacinação com a proteína recombinante CP09720, através da quantificação dos anticorpos IgG1 e IgG2a e das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-12.

2. METODOLOGIA

O gene *cp1002_RS09720* foi amplificado por PCR e posteriormente clonado em plasmídeo pAE, entre os sítios de restrição *Bam*HI e *Eco*RI.

Para expressão da proteína rCP09720, foi realizada a transformação por choque térmico da cepa *E. coli* BL21 (DE3) Star com o plasmídeo pAE/*cp09720* construído anteriormente. Um pré-inóculo foi realizado em meio Luria-Bertani líquido (LB), seguido por ampliação de escala de cultivo, incubado sob agitação em shaker orbital a 37°C *overnight*. Após atingir a densidade óptica desejada (entre 0,6 e 0,8) o cultivo foi induzido com IPTG e, após 3 h foi centrifugado por 15 min a 7000 g. O *pellet* foi tratado com PBS estéril, seguindo para a etapa de

lise celular, através de sonicação. Logo após, seguiu-se para as etapas de filtração e purificação da proteína de interesse a partir de cromatografia líquida em coluna de sefarose com afinidade ao níquel, e posterior diálise. A confirmação da identidade da proteína foi realizada através western blot com anticorpo monoclonal anti-6x-histidina.

Para avaliação da resposta imune, 30 camundongos do tipo BALB/c de 6 a 8 semanas foram divididos em dois grupos com 15 animais cada, sendo que o grupo G1 recebeu formulação contendo 50 µg da proteína recombinante rCP09720 associada ao adjuvante Al(OH)₃, enquanto que o grupo G2 recebeu apenas solução salina, sendo considerado como grupo controle. Ambos foram vacinados por via subcutânea, em duas doses com intervalo de 21 dias entre elas. Coletas de sangue foram realizadas nos dias 0, 21 e 42 de experimento, sendo que o dia 0 foi considerado como o primeiro dia de vacinação. O sangue foi centrifugado para separação de suas frações e o soro seguiu para avaliação da resposta imune humoral através de ELISA indireto, na qual os níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a foram quantificados..

Para análise da resposta imune celular, três animais de cada grupo foram eutanasiados para retirada de seus baços e posterior isolamento e cultivo de seus esplenócitos. A quantificação dos níveis das citocinas IFN-γ, IL-4, IL-10 e IL-12 foi realizada por PCR em tempo real.

As análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism 5.0, através de análise unidirecional de variância (One-Way ANOVA), seguido pelo pós-teste de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após realizada a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida e posterior western blot, observou-se uma banda correspondente a uma proteína de 34 kDa, comprovando a expressão e identidade da proteína recombinante rCP09720.

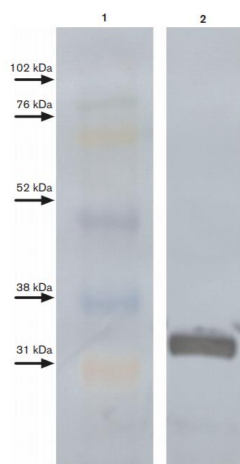


Figura 1: Western blot com anticorpo monoclonal anti-6x-histidina.

1- Marcador de peso molecular; 2- rCP09720 purificada.

Quanto aos níveis de resposta imune humoral, observou-se que o grupo vacinado com a proteína recombinante CP09720 apresentou altos níveis de produção de anticorpos IgG1 e IgG2a logo após a primeira dose vacinal, apresentado diferenças significativas do grupo controle, vacinado apenas com solução salina.

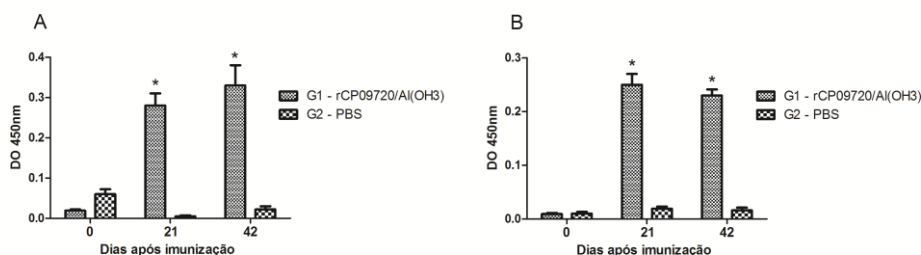


Figura 2: Níveis de produção de anticorpos do tipo IgG1 e IgG2a nos diferentes grupos vacinados em diferentes dias de experimento.

A: IgG1 B: IgG2a

Na resposta imune celular, o grupo vacinado (G1) apresentou alta produção da citocina IFN- γ , enquanto que as citocinas IL-4, IL-10 e IL-12 não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados ao grupo controle.

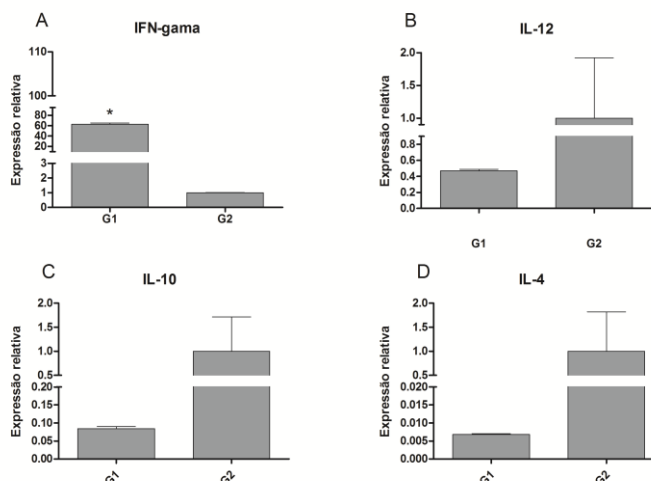


Figura 3: Níveis de citocinas IFN- γ , IL-12, IL-10 e IL-4 nos diferentes grupos vacinados, após 42 dias de experimento.

G1: rCP09720; G2: PBS

Esses resultados sugerem bons níveis de resposta imune humoral e uma resposta imune celular do tipo Th1, tendo em vista que houve um aumento considerável na produção de INF- γ e as interleucinas não apresentaram aumento significativo quando comparadas ao controle. O INF- γ sinaliza a presença de infecção para que outras células do sistema imune possam atuar em seu combate (REBOUÇAS et al., 2011). Ainda, estudos já demonstraram que a resposta Th1 é considerada o principal mecanismo contra a infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* (CHAPLIN et al., 1999), demonstrando assim, alto potencial vacinal da formulação apresentada.

4. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados apresentados, a presente formulação vacinal apresentou bons níveis de indução nos níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a e citocinas IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-12, demonstrando potencial promissor para uso como vacina vetorizada para LC. Novos testes deverão ser realizados, a fim de confirmar sua eficácia através de desafio com a cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

D'AFONSECA, V. et al. Survey of genome organization and gene content of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Microbiological research**, Dinamarca, v.165, n.4, p.312-320, 2010.

FONTAINE, M.C. et al. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine**, v.24 (33-34), p.5986–5996, 2006.

DORELLA, F.A. et al. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. **Expert review of vaccines**, v.8, p.205–213. 2009.

RIBEIRO, D. et al. An iron-acquisition-deficient mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis* efficiently protects mice against challenge. **Veterinary research**, v.45, p. 28. 2014.

SEYFFERT, N. et al. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Veterinary science**, v.88, p.50–55, 2010.

REZENDE, A.F. et al. *In silico* identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigenic targets and application in immunodiagnosis. **J Med Microbiol.** v.65 p.521-529. 2016.

REBOUÇAS, M.F. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted antigen induced specific gamma-interferon production by peripheral blood leukocytes: potential diagnostic marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats. **J Vet Diagn Invest**; v.23, p.213–220. 2011.

CHAPLIN, P.J. et al. Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. **Infect Immun.** v.67, p.6434–6438. 1996.