

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS VACINAIS UTILIZANDO *cp1002_RS01850* de *Corynebacterium pseudotuberculosis* PARA O CONTROLE DA LINFADENITE CASEOSA

NICOLE RAMOS SCHOLL¹; LUIZA DOMINGUES MORON²; MARA THAIS DE
OLIVEIRA SILVA²; RODRIGO BARROS DE PINHO²; ANDREA DE FÁTIMA
SILVA REZENDE²; SIBELE BORSUK³

¹Universidade Federal de Pelotas – nicoleramosscholl@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – moronluiza@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – marathaisos@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – rodrigobpinho@hotmail.com

²Instituto Federal do Paraná – andrea.rezende@ifpr.edu.br

³Universidade Federal de Pelotas – sibelevborsuk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença infectocontagiosa, que acomete principalmente pequenos ruminantes, sendo caracterizada pela presença de abscessos nos animais infectados com essa enfermidade (STANFORD *et al.*, 1998; WILLIAMSON, 2001). A LC possui distribuição mundial e alta prevalência, sendo descrita principalmente em países que possuem a ovinocaprinocultura como importante atividade econômica, como o Brasil (SEYFFERT *et al.*, 2010). *Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente etiológico da LC, uma bactéria refratária a antibioticoterapia, principalmente nos casos em que a mesma encontra-se na sua condição intracelular ou quando é capaz de formar biofilmes (OLSON *et al.*, 2002). Por este motivo, a profilaxia demonstra-se como a principal maneira de proteção contra a LC, no entanto as vacinas comerciais disponíveis atualmente possuem efeitos colaterais e não são capazes de gerar a proteção e eficiência desejadas (WILLIAMSON 2001).

Deste modo, visando a obtenção de uma vacina eficaz, diversas estratégias têm sido utilizadas, como por exemplo vacinas de DNA e de subunidade recombinante, consideradas mais seguras e com taxas de proteção variando de acordo com o antígeno selecionado (MOYLE, 2017).

Análises bioinformáticas, como a análise de densidade de epítópos maduros (MED) a qual o pan-secretoma de *C. pseudotuberculosis* foi submetido, possibilitaram uma seleção mais eficiente de possíveis抗ígenos que poderiam vir a compor formulações vacinais recombinantes contra LC (SANTOS *et al.*, 2013). Como resultado, a fosfatase ácida, codificada pelo gene *cp1002_RS01850* de *C. pseudotuberculosis*, foi classificada como o terceiro alvo mais imunogênico para uso em vacinas contra LC (REZENDE *et al.*, 2016).

A associação de rCP01850 com a proteína rPLD adjuntas ao adjuvante saponina, foi capaz de aumentar significativamente a taxa de proteção dos animais testados contra LC (SILVA *et al.*, 2018), no entanto, a ação de rCP01850 sozinha em uma vacina para LC ainda não foi demonstrada. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial vacinal de *cp1002_RS01850* em vacinas de DNA e de subunidade recombinante contra a infecção causada por *C. pseudotuberculosis*.

2. METODOLOGIA

A clonagem do gene *cp1002_RS01850* foi realizada em células de *E. coli* TOP10, utilizando o vetor pAE. A expressão da proteína foi realizada em *E. coli* BL21 (DE3) através do plasmídeo recombinante pAE/cp01850 seguindo o protocolo de Rezende *et al.*, (2016). A avaliação da antigenicidade da proteína rCP01850 foi realizada por Western blot utilizando amostras de soro de ovelhas positivas ($n = 10$) e negativas ($n = 1$) para LC. Para construção da vacina de DNA o gene *cp1002_RS01850* foi amplificado por PCR e clonado no vetor pTARGET usando o sistema *pTARGET™ Mammalian Expression Vector* (Promega).

Para a avaliação da expressão da proteína *in vitro* foram utilizadas células de ovário de hamster chinês (CHO) cultivadas em placas de microtitulação de 96 cavidades em meio DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco). Ao atingirem 80% de confluência, as células foram transfetadas com 1 μ g de DNA de plasmídeos pTARGET/cp01850 ou pTARGET (controle negativo) usando Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen). A expressão *in vitro* da proteína recombinante CP01850 foi avaliada por ensaio de imunofluorescência indireta (IFA) após 48 horas. Foram utilizados os anticorpos policlonais anti-IgG rCP01850 (1:100) produzidos em camundongos, e anticorpos policlonais anti-IgG de camundongo conjugados com FITC (isotiocianato de fluoresceína) (1:80) (Millipore).

Para o ensaio de imunização foram utilizados 25 camundongos BALB/c fêmeas entre seis a oito semanas de idade alocados em cinco grupos contendo cinco animais cada. Os animais foram imunizados por via intramuscular nos dias 0, 21 e 42, com as seguintes formulações: G1 inoculado com vacina de DNA (100 μ L) contendo 50 μ g pTARGET/cp01850 em cada dose; G2 inoculado com 100 μ L de vacina recombinante rCP01850 (50 μ g) associada ao adjuvante hidróxido de alumínio Al(OH)₃ (15%, v/v) em cada dose; G3 inoculado nos dias 0 e 21 com a vacina de DNA (pTARGET/cp01850), e no dia 42 com um reforço da vacina de subunidade recombinante rCP01850/Al(OH)₃; G4 como controle negativo, foi inoculado com 100 μ L da vacina de DNA contendo apenas 50 μ g de pTARGET; e G5, também controle negativo, inoculado com 100 μ L de Al(OH)₃ (15%). O desafio foi realizado 21 dias após a última inoculação utilizando 10⁴ UFC/mL da cepa Mic-6 de *C. pseudotuberculosis*, administrada por via intraperitoneal. Os animais foram monitorados por 30 dias após o desafio.

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$. Os testes foram realizados com o software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego Califórnia, EUA), versão 5.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão da proteína recombinante CP01850 em *E. coli* ocorreu como o esperado, apresentando peso molecular de aproximadamente 35 kDa. A antigenicidade de rCP01850 foi confirmada através do seu reconhecimento por soros de ovelhas com LC (Figura 1).

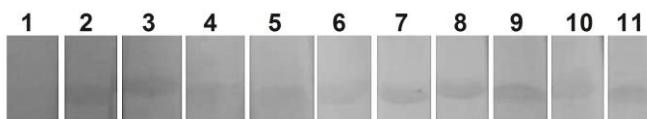


Figura 1. Western blot da proteína rCP01850 expressa em *Escherichia coli*. A antigenicidade da proteína foi determinada usando soros de ovelha positivos e

negativos para LC. Soro de ovelha negativo (1). Soros de ovelha positivos de 10 animais com LC clínico (2 a 11).

Em adição, uma fluorescência intensa foi detectada nas células CHO transfectadas com o vetor pTARGET/cp01850, comprovando assim a expressão *in vitro* de rCP01850 (Figura 2B). Em contraste, as células transfectadas apenas com o vetor pTARGET (controle negativo) não demonstraram fluorescência, como esperado (Figura 2A).

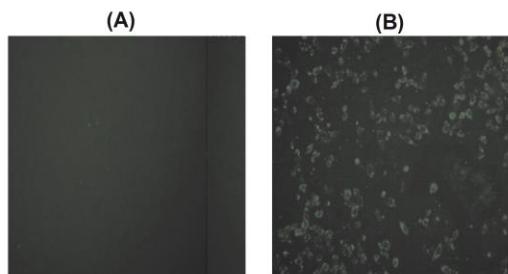


Figura 2. Imunofluorescência indireta mostrando expressão *in vitro* da proteína CP01850 em células de ovário de hamster chinês (CHO) transfectadas com vetor de DNA pTARGET (A) e pTARGET/cp01850 recombinante (B).

Após o ensaio de desafio, todos os animais pertencentes aos grupos G1, G3, G4 e G5 vieram a óbito entre o 12º e 17º dia pós-desafio (Figura 3). Em contrapartida G2 apresentou aumento na sobrevida ($p<0,05$) e o último óbito foi observado tardivamente, no 24º pós-desafio.

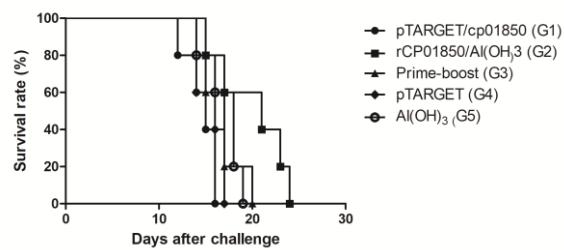


Figura 3. Curva de sobrevivência dos camundongos imunizados com as vacinas de DNA e/ou subunidade recombinante formuladas com cp1002_RS01850. 21 dias após a última imunização, cinco camundongos em cada grupo experimental foram desafiados com 10^4 UFC/mL da cepa Mic-6 de *C. pseudotuberculosis*. Os animais foram monitorados até o 24º dia após o desafio.

Resultados semelhantes em que a taxa de sobrevida aumentou mesmo que as formulações não tenham gerado proteção no desafio de *C. pseudotuberculosis* foram relatados quando as proteínas rPLD e rHsp60 foram utilizadas em vacinas de subunidades recombinantes contra LC (FONTAINE *et al.*, 2006; PINHO *et al.*, 2009). Segundo Brum *et al* (2017) a vacina de DNA utilizando CP09720 apresentou uma taxa de proteção de apenas 16% apesar do aumento da taxa de sobrevida em alguns grupos testados (BRUM *et al.*, 2017).

4. CONCLUSÕES

Nenhuma das estratégias vacinais avaliadas neste estudo foram eficazes em conferir proteção contra o desafio com a cepa Mic-6 de *C. pseudotuberculosis*. Acredita-se que apenas o uso de rCP01850 é ineficaz em fornecer níveis adequados de proteção, necessitando de uma posterior avaliação de quais proteínas importantes relacionadas a patogênese de *C. pseudotuberculosis* poderiam ser associadas ao mesmo para maximizar a proteção obtida.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRUM, A.A.; REZENDE, A.F.S.; BRILHANTE, F.S. *et al.* Recombinant esterase from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit recombinant vaccines partially protect mice against challenge. *J. Med. Microbiol.*, v.66, p.635-642, 2017.
- FONTAINE, M.C.; BAIRD, G.; CONNOR, K.M. *et al.* Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vaccine*, v.24, p.5986-5996, 2006.
- MOYLE, P. M. Biotechnology approaches to produce potent, self-adjuvanting antigen-adjuvant fusion protein subunit vaccines. *Biotechnology Advances*, [S. I.], v. 35, n. 3, p. 375–389, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.005>.
- OLSON, M.E.; CERI, H.; MORCK, D.W. *et al.* Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.*, v.66, p.86-92, 2002.
- PINHO, J.M.R.; DORELLA, F.A.; COELHO, K.S. *et al.* Immunization with recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis* heat-shock protein (Hsp)-60 is able to induce an immune response in mice, but fails to confer protection against infection. *Open Vet. Sci. J.*, v.3, p.22-27, 2009.
- REZENDE, AF.; BRUM, A.A.; REIS, C.G. *et al.* In silico identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigenic targets and application in immunodiagnosis. *J. Med. Microbiol.*, v.65, p.521- 529, 2016.
- SANTOS, A.R.; PEREIRA, V.B.; BARBOSA, E. *et al.* Mature epitope density - a strategy for target selection based on immunoinformatics and exported prokaryotic proteins. *BMC Genomics*, v.14, Suppl.6, p.S4, 2013.
- SEYFFERT, N.; GUIMARÃES, A.S.; PACHECO, L.G. *et al.* High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. *Res. Vet. Sci.*, v.88, p.50-55, 2010.
- SILVA, M.T.O.; BEZERRA, F.S.B.; PINHO, R.B. *et al.* Association of *Corynebacterium pseudotuberculosis* recombinant proteins rCP09720 or rCP01850 with rPLD as immunogens in caseous lymphadenitis immunoprophylaxis. *Vaccine*, v.36, p.74-83, 2018.
- STANFORD, K. *et al.* The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. *Canadian Journal of Veterinary Research*, [S. I.], v. 62, n. 1, p. 38–43, 1998.
- WILLIAMSON, L. H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, [S. I.], v. 17, n. 2, p. 359–371, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30033-5](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30033-5).