

AValiação DO POTENCIAL ADJUVANTE DO EXTRATO LIPÍDICO DE *IRIDAEA CORDATA* ASSOCIADO COM A PROTEÍNA RECOMBINANTE CP01850 DE *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS* NA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM OVELHAS IMUNIZADAS

Eshiley Shaiane Costa Mendes¹; Nicole Ramos Scholl², Fernanda Kanaan de Azambuja², Gustavo dos Santos Hartleben², Henrique Gonçalves Pegoraro²; Sibele Borsuk³

¹Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPEl – eshiley.cmendes@gmail.com

²Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPEl – nicoleramosscholl@hotmail.com

²Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPEl – nandakanaan_02@hotmail.com

²Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPEl – gustavo-hart@hotmail.com

²Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPEl – henrique.pegoraro2@gmail.com

³Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPEl – sibeleborsuk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A linfadenite caseosa (LC), causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, é uma doença infecciosa que afeta rebanhos de ovinos e caprinos, caracterizada pelo surgimento de abscessos nos linfonodos. Na forma intracelular, *C. pseudotuberculosis* fica envolta de uma densa camada de material caseoso, o que torna o tratamento com antibióticos ineficaz (GUIMARÃES et al., 2011). Como resultado, essa doença causa perdas econômicas significativas em países que possuem rebanhos de ovinos e caprinos, como o Brasil (DORELLA et al., 2006). Portanto, a medida mais eficaz para controlar a LC é a prevenção por meio de vacinas, no entanto, atualmente não há vacinas disponíveis no mercado que ofereçam proteção satisfatória contra o patógeno (COSTA et al., 2011).

Diversas estratégias de vacinação têm sido avaliadas ao longo dos últimos anos, um exemplo é o estudo de Bezerra e colaboradores (2020) no qual foi investigado o efeito adjuvante do óleo de própolis vermelha que associado a rCP01850 foi capaz de induzir uma resposta imune humoral significativa anti-*C. pseudotuberculosis* com uma taxa de sobrevivência de 70% significativamente maior do que os outros grupos experimentais. Diante disso, os compostos naturais têm sido alvo de pesquisas, incluindo a alga *Iridaea cordata*, que possui polissacarídeos com propriedades imunomoduladoras, capazes de estimular o sistema imunológico e com grande potencial para serem utilizados como adjuvantes em vacinas (Barbosa TN et al., 2023). Barbosa et al (2023) avaliaram o uso de extratos lipídicos como adjuvante vacinal associado a proteína rCP01850 em camundongos como uma vacina para LC, e uma indução significativa de anticorpos, bem como de citocinas foi observada.

A proteína fosfatase ácida CP01850 de *C. pseudotuberculosis* foi classificada como um dos alvos mais promissores para o desenvolvimento de vacinas contra LC de acordo com o estudo de Bezerra e colaboradores (2021) onde mostra que a forma recombinante desta proteína protegeu 60% dos animais vacinados desafiados com a cepa patogênica de *C. pseudotuberculosis* MIC-6.

Em vista disso, este estudo teve por objetivo demonstrar se o extrato lipídico de *Iridaea cordata* possui potencial de gerar uma resposta imune humoral quando utilizado como adjuvante e associado à rCP01850 em uma formulação vacinal administrada em ovelhas para o controle de LC.

2. METODOLOGIA

Para este estudo, foram utilizadas amostras de *Iridaea Cordata* coletadas na região de Punta Arenas, localizada na Península de Brunswick, Chile. A coleta e o processamento do extrato lipídico foi feito pelo laboratório parceiro de Lipidômica e Bio-orgânica da Universidade Federal de Pelotas, o qual também realizou a caracterização dos compostos lipídicos que integravam o extrato.

A proteína rCP01850 de *C. pseudotuberculosis* foi expressa de forma recombinante seguindo a metodologia descrita por (REZENDE et al., 2016). Resumidamente, para a expressão da proteína foi escolhido o microrganismo de *Escherichia coli* BL21. A cultura permaneceu sob agitação a 37 °C por 3 h em agitador orbital. Posteriormente, o cultivo foi centrifugado a 7.000 rpm por 15 min a 4 °C, e o sobrenadante resultante foi purificado por cromatografia de afinidade ao níquel em uma coluna Sepharose (HisTrap, GE Healthcare). Um *Western blotting* foi realizado para caracterização da identidade da proteína utilizando anticorpo monoclonal anti-6xhis tag.

Para o ensaio de imunização, foram utilizadas ovelhas fêmeas com idades entre 1 e 2 anos, fornecidas pelo Centro Agropecuário da Palma (CAP) e aprovado sob o número 23110. A imunização dos animais foi realizada em 24 ovelhas organizadas em 4 grupos. Foram imunizados da seguinte forma: Grupo 1 (G1) - com 0,9% de NaCl; Grupo 2 (G2) - rCP01850 (200 µg) ; Grupo 3 (G3) - rCP01850 (200 µg) combinado com 2 mg de saponina e Grupo 4 (G4) – rCP01850 (200 µg) combinado com 2 mg de extrato lipídico *Iridaea cordata*. Cada grupo recebeu duas doses de vacina com intervalo de 30 dias de forma subcutânea. O sangue foi coletado por punção da veia jugular nos dias 0, 30, 60, 90 e 150 após a imunização.

Para a avaliação da resposta imune humoral, foi realizado um Elisa indireto usando amostras de soro de ovelhas imunizadas para quantificar os anticorpos IgG totais produzidos contra a proteína alvo rCP01850. Placas de poliestireno de 96 cavidades foram revestidas com 100 µL de tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,8) contendo rCP01850 (0,2 µg/cavidade). Em seguida, as placas foram incubadas por 18 h a 4 °C e posteriormente lavado três vezes com PBS-T. Posteriormente, as placas foram incubadas por 2h com 5% de leite desnatado (200 µL/cavidade) diluídos em PBS-T a 37 °C e lavadas três vezes. Todas as amostras de soro de ovelha foram diluídas em 300 µL de PBS, e 100 µL de cada amostra diluída foram adicionados às placas em duplicata. Após, as placas foram incubadas por 1 h a 37 °C. Foram feitas três lavagens com PBS-T, e então foram adicionados 100 µL de IgG total conjugada com peroxidase (Sigma-Aldrich) por cavidade. As placas foram incubadas a 37 °C por 1 h e depois lavado três vezes com PBS-T. A revelação das placas foi feita através da adição de 100 µL/cavidade da solução substrato-cromógeno contendo OPD e estas foram incubadas a temperatura ambiente no escuro por 15 min. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL/cavidade de H₂O₂ a 3% solução. A densidade óptica foi determinada por espectrofotometria com o comprimento de ondas em 492 nm.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 8.0. As diferenças nos níveis totais de produção de IgG em diferentes grupos foram analisadas por ANOVA unidirecional, seguido por pós teste de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a obtenção da rCP01850, a identidade da proteína foi confirmada pela técnica de *Western blotting* (Figura 1) utilizando um anticorpo monoclonal anti-6xHis tag, que resultou na visualização de uma banda no tamanho esperado de aproximadamente 33,5 kDa. O rendimento foi de 8,2 mg/L.

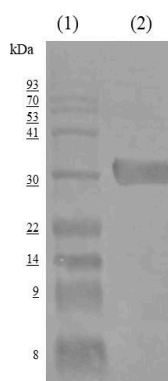


Fig. 1. Confirmação da identidade da proteína rCP01850 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* por *Western blotting* com anticorpo monoclonal anti-6xHis tag (Mab). 1: marcador de peso molecular de proteína pré-corado; 2: rCP01850 a proteína recombinante tinha uma banda reativa de aproximadamente 33,5 kDa.

Como método avaliativo foi realizado um teste de ELISA indireto, podendo ser observado na figura 2. Os resultados indicam que, ao longo do experimento, a produção total de IgG anti-rCP01850 não apresentou diferença estatística significativa entre o grupo G2 (rCP01850) e o grupo controle G1 (salina). Em contrapartida, os grupos G3 (rCP01850 + saponina) e G4 (rCP01850 + *I. cordata*) mostraram um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de IgG anti-rCP01850 nos dias 30 e 60 após a imunização, embora sem diferenças significativas entre eles. No entanto, no dia 90 pós-imunização, o grupo G4 apresentou uma produção total de IgG anti-rCP01850 significativamente maior ($p < 0,05$) do que o G3, mantendo essa diferença até o final do experimento. No dia 150 pós-imunização, o G4 produziu quantidades de IgG anti-rCP01850 significativamente superiores em comparação com os grupos G1, G2 e G3.

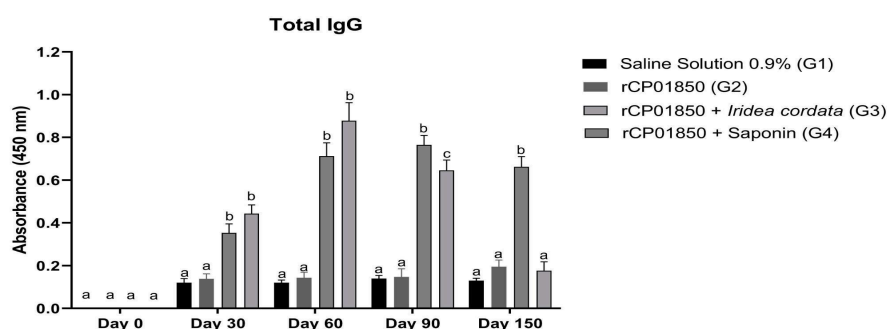


Fig. 2. Níveis totais de anticorpos IgG total anti-rCP01850 nos dias 0, 30, 60, 90 e 150 após a imunização com *C. pseudotuberculosis* rCP01850 com extrato lipídico *I. cordata*.

Estudos demonstraram que compostos bioativos, como as macroalgas, podem interagir com o sistema imunológico do organismo (Paulo C et al., 2020). Por sua vez, extratos de macroalgas podem auxiliar na busca por novos adjuvantes que possam estimular a resposta imune humoral e ativar a produção de imunoglobulinas (Bianco et al., 2012). Neste estudo, avaliamos o potencial do extrato lipídico de *Iridaea cordata* como adjuvante em uma formulação vacinal. Os resultados mostraram que, enquanto a produção total de IgG anti-rCP01850 não variou significativamente entre o grupo de controle e o grupo com rCP01850 isoladamente, a combinação do extrato de *I. cordata* com a rCP01850 (G4) resultou em um aumento significativo nos níveis de anticorpos em comparação com o grupo que recebeu um adjuvante comercial (G3). Isto demonstra que o extrato de *I. cordata* não apenas é capaz de induzir uma resposta imune comparável à de adjuvantes tradicionais, mas também proporciona uma resposta mais duradoura, mantendo os níveis de IgG elevados por um período prolongado. Esses achados ressaltam o potencial do extrato lipídico como uma alternativa viável e eficaz aos adjuvantes convencionais, indicando sua relevância em futuras pesquisas e aplicações vacinais.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados, conclui-se que o grupo G4, imunizado com a proteína recombinante rCP01850 associada ao extrato lipídico de *I. cordata*, apresentou uma resposta imune humoral significativamente superior, principalmente a partir do dia 90 pós-imunização, em comparação com os demais grupos. Esses resultados demonstram o potencial adjuvante do extrato de *Iridaea cordata*, destacando sua capacidade de estimular uma resposta imune prolongada e eficaz. Portanto, o extrato lipídico mostra-se promissor como adjuvante na formulação de vacinas contra a linfadenite caseosa, podendo contribuir para o desenvolvimento de estratégias imunoproláticas mais eficientes no controle dessa doença infecciosa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- DE SÁ GUIMARÃES, A.; DO CARMO, F.B.; PAULETTI, R.B.; SEYFFERT, N.; RIBEIRO, D.; LAGE, A.P.; HEINEMANN, M.B.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; GUIMARÃES GOUVEIA, A.M. Caseous Lymphadenitis: Epidemiology, Diagnosis, and Control. **IIOAB** J. 2011, 2, 33–43.
- DORELLA, FA; PACHECO, LGC; OLIVEIRA, SC; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium Pseudotuberculosis*: Microbiology, Biochemical Properties, Pathogenesis and Molecular Studies of Virulence. **Veterinary Research**. 2006, 37, 201–218.
- DE OLIVEIRA SILVA, M.T.; BEZERRA, F.S.B.; DE PINHO, R.B.; BEGNINI, K.R.; SEIXAS, F.K.; COLLARES, T.; PORTELA, R.D.; AZEVEDO, V.; DELLAGOSTIN, O.; BORSUK, S. Association of *Corynebacterium Pseudotuberculosis* Recombinant Proteins RCP09720 or RCP01850 with RPLD as Immunogens in Caseous Lymphadenitis Immunoprophylaxis. **Vaccine** 2018, 36, 74–83.
- BEZERRA, F. S. B., REZENDE, A. F. S., SILVA, M. T. de O., SENA-LOPES, Â., ROESCH-ELY, M., HENRIQUES, J. A. P., PADILHA, F. F., AZEVEDO, V. A. C., PORTELA, R. W. D., SEIXAS, F. K., COLLARES, T. V., & BORSUK, S. The combination of Brazilian red propolis and recombinant protein rCP01850 in the immunoprophylaxis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Vaccine** 2020, 149, 104–354.