

MYCOBACTERIUM BOVIS BCG EXPRESSANDO AS PROTEÍNAS CP40 OU CP09720 DE CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS PROMOVE PROTEÇÃO EM CAMUNDONGOS APÓS DESAFIO

**GUSTAVO DOS SANTOS HARTLEBEN¹; MATHEUS CANIELES NEVES²;
FELIPE RIBEIRO GASTAL²; RODRIGO BARROS DE PINHO²; HENRIQUE
GONÇALVES PEGORAGO²; SIBELE BORSUK³**

¹Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPel – gustavo-hart@hotmail.com.br

²Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPel – lipegastal@gmail.com

²Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPel – rodrigobpinho@hotmail.com

²Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPel – matheuscneves00@gmail.com

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

³Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPel – sibleborsuk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria intracelular facultativa, responsável pela Linfadenite Caseosa (LC), uma patologia que acomete ovinos e caprinos caracterizada pela formação de abscessos nos linfonodos dos animais infectados (DORELLA et al., 2006). Devido a formação de abscessos, o tratamento com antibióticos para LC é ineficaz, nesse sentido, medidas profiláticas representam a alternativa mais viável para o controle da LC (SENTURK et al., 2021 e TESFAHUN B et al., 2022). Entretanto, as atuais vacinas comercializadas não são imunologicamente satisfatórias, demonstrando a necessidade de novas formulações vacinais para o controle dessa doença (COSTA et al., 2011).

No ramo da vacinologia, diversos alvos foram abordados nos últimos anos, como as proteínas CP40 e CP09720, dois antígenos consolidados como alvos vacinais para LC (SHADNEZHAD et al., 2016), enquanto, no mesmo contexto, as vacinas recombinantes vetorizadas apresentaram grande potencial na profilaxia de LC, especialmente quando *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) foi adotado como sistema de expressão (LEAL et al., 2018).

Nesse aspecto, o objetivo desse estudo foi avaliar formulações vacinais utilizando BCG como vetor de expressão para as proteínas rCP40 e rCP09720 como imunógenos, assim como a sobrevivência de murinos vacinados após serem desafiados com a cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis* MIC-6.

2. METODOLOGIA

C. pseudotuberculosis MIC-6 foi cultivada em meio BHI à 37°C, e *E. coli* BL21 (DE3) Star e TOP10 em meio LB (com antibiótico quando necessário) e *M. bovis* BCG em meio 7H9 suplementado.

Os genes CP40 e CP09720 foram amplificados por PCR a partir do genoma de *C. pseudotuberculosis* 1002 e clonados no vetor pUS2000. Para realizar a expressão das proteínas, os genes também foram clonados em vetor pAE e transformados em *E. coli* BL21 (DE3) Star, permitindo a produção e purificação das proteínas recombinantes rCP40 e rCP09720 por cromatografia de afinidade ao níquel. A identidade das proteínas foi confirmada por Western blot, assim como sua concentração foi verificada por kit comercial (BCA; Pierce)

Para produção do soro policlonal, foram realizadas três doses intramusculares de rCP40 ou rCP09720 com hidróxido de alumínio em camundongos Balb/c, mantendo um intervalo de 15 dias entre as doses. O soro foi coletado e utilizado para confirmar a expressão das proteínas recombinantes em rBCG a partir da técnica de Western blot.

A formulação vacinal foi padronizada para 10^7 UFC/mL de rBCG em PBS 1X. Para a experimentação animal, 60 camundongos Balb/c foram distribuídos em seis grupos experimentais: G1 (Solução Salina 0,9%); G2 (BCG Pasteur); G3 (rBCG/pUS2000/CP40); G4 (rBCG/pUS2000/CP09720); G5 (rBCG/pUS2000/CP40 + rCP40 e G6 (rBCG/pUS2000/CP09720 + rCP09720). As imunizações ocorreram nos dias 0 e 21, assim como as coletas de sangue nos dias 0, 21 e 42. Os animais foram então desafiados com cepa patogênica de *C. pseudotuberculosis* MIC-6, e permaneceram sobre observação por 40 dias para sinais de eutanásia, como letargia e perda de peso.

Para avaliar a resposta imune humoral, foi realizado o teste de ELISA indireto, utilizando os soros coletados durante a experimentação animal para avaliar os níveis de IgG total. E, para avaliar a resposta celular foi analisada a partir de esplenócitos estimulados com as proteínas recombinantes rCP40 e rCP09720, quantificando IFN- γ , IL-10 e IL-17 por RT-qPCR.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As proteínas recombinantes CP40 e CP09720 expressas e purificadas em *E.coli* apresentaram o rendimento de 7,5 mg/L e 6,5 mg/L, respectivamente. A identidade das proteínas foi confirmada por *Western Blot* a partir do anticorpo anti-histidina, o qual revelou duas bandas de tamanho esperado de 40 kDa e 35kDa para as proteínas rCP40 e rCP09720, respectivamente, conforme mostra a figura 1.

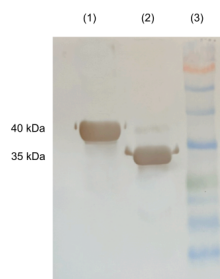


Fig. 1 Western Blot realizado utilizando anticorpo anti-6xhistag. (1) rCP09720; (2) rCP40; (3) Marcador de peso molecular de proteína pré-corado (Thermo Scientific).

A expressão das proteínas recombinantes em rBCG foi confirmada por Western Blot a partir de soros policlonais anti-rCP40 ou anti-rCP09720. Ambas as proteínas apresentaram o tamanho esperado, assim como ausência de bandas no controle negativo (BCG Pasteur).

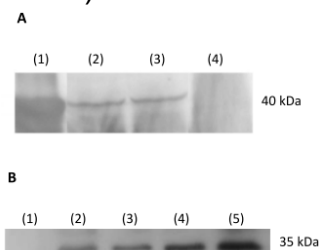


Fig 2. Western blot realizado para avaliar a expressão em rBCG. (A) WB usando o anticorpo anti-rCP40 (1) rCP40 purificado; (2) clone 1 de rBCG/pUS2000/cp40; (3) rBCG/pUS2000/cp40 clone 2; (4) BCG Pasteur não transformado. (B) WB usando anticorpo anti-rCP09720 (1) BCG Pasteur não transformado; (2) clone 1 de rBCG/pUS2000/cp09720; (3) rBCG/pUS2000/cp09720 clone 2; (4) rBCG/pUS2000/cp09720 clone 3; (5) rCP09720 purificada.

Os níveis de produção de IgG total entre os grupos vacinados (G2, G3, G4, G5 e G6) não foram estatisticamente significativos nos dias 0 e 21, quando comparados ao grupo controle (G1) (Fig 3). Contudo, no dia 42, os níveis de IgG total dos grupos G5 e G6 (rBCG reforçado pela proteína purificada) foram estatisticamente maiores que G1.

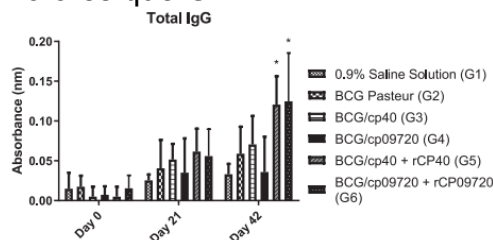


Fig 3. Níveis de IgG Total induzidos por diferentes formulações vacinais em camundongos Balb/c. Os resultados são descritos pela média do desvio padrão (barras) de absorbância (nm) obtido por ELISA indireto; “*” representa diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no mesmo momento de amostragem ($p < 0,05$)

Para avaliar a resposta imune celular, foi medido os níveis de transcrição de IFN- γ , IL-10 e IL-17. IFN- γ e IL-10 apresentaram aumento significativo em G3 em comparação ao grupo controle, enquanto IL-17 mostrou elevação significativa em G5 (Fig 4)

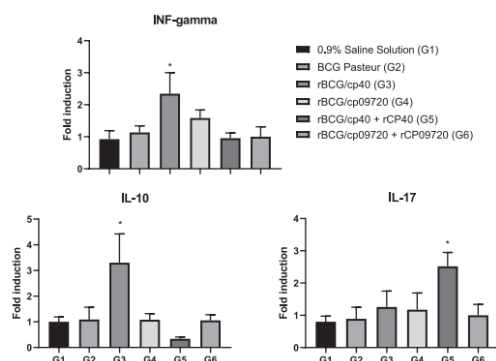


Fig 4. O perfil de citocinas de camundongos imunizados com as formulações vacinais e seu controle. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão (barras) e foram avaliados estatisticamente pelo teste unidirecional ANOVA e testes post hoc de Tukey; “*” indica diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no mesmo momento de amostragem ($p < 0,05$).

Por fim, uma alta taxa de proteção foi observada em todos os grupos experimentais, sendo todos significativamente diferentes em comparação com o controle (G1). Destacando-se G5, cujo rBCG/CP40 com dose reforço de 50 μ g de rCP40 purificada exibiu uma taxa de sobrevivência de 90%, enquanto o grupo vacinado apenas com rBCG/CP40 apresentou apenas 60% de taxa de sobrevivência. Por sua vez, G2 (BCG Pasteur) protegeu 70% dos animais imunizados.

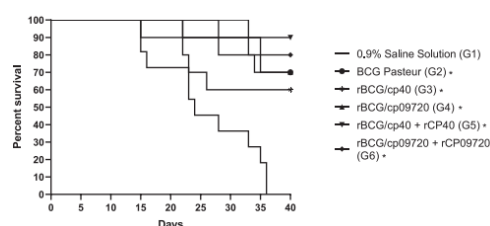


Fig 5. Curva de sobrevivência de animais imunizados com diferentes formulações vacinais após serem desafiados com uma cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis* MIC-6 e observado por 40 dias; “*” indica diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de tratamento e o grupo controle (G1) ($p < 0,05$).

Neste estudo, visou-se avaliar vacinas recombinantes baseadas em *Mycobacterium bovis* BCG expressando proteínas de *C. pseudotuberculosis*, combinadas ou não com reforço de proteínas purificadas.

G3 apresentou maiores níveis de IFN- γ e IL-10. Citocinas conhecidas por promoverem o reforço da capacidade fagocítica de macrófagos, controle da infecção e a regulação dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra o patógeno (DORELLA et al., 2009; LEAL et al., 2018 e DIHN THI et al., 1998).

G5 apresentou o maior nível de proteção (90%) e o nível de IL-17 foi significativamente ($p < 0,05$) maior do que em todos os outros grupos. O que corrobora com os resultados similares já encontrados, como o de Silva e colaboradores (2020) no qual o grupo que demonstrou maiores níveis de IL-17 foi o que obteve maior proteção do desafio (70%) utilizando o antígeno rNanH. Indicando assim a forte relação de IL-17 com a proteção eficaz contra a LC.

Sendo assim, os grupos G3 e G5, os quais foram utilizados a proteína rCP40, induziram uma forte resposta imune celular. Esses resultados indicam que rBCG pode apresentar o antígeno de maneira mais eficiente ao sistema imunológico do hospedeiro, o que tende a gerar uma resposta protetora específica para esse gene.

4. CONCLUSÕES

A combinação rBCG/pUS2000/CP40 com reforço de rCP40 purificada promoveu 90% de proteção após o desafio, induzindo uma resposta imune humoral e celular. Essa combinação de respostas se provou uma estratégia completa contra a *C. pseudotuberculosis*. Além disso, a formulação rBCG/pUS2000/CP40, a qual apresentou níveis aumentados de IFN- γ , também foi eficaz contra Linfadenite caseosa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DORELLA, F.A.; PACHECO, L.G.C.; OLIVEIRA, S.C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 205–213, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1586/14760584.8.2.205>.

GUIMARÃES, A.S.; SEIXAS, F.K.; BASTOS, B.L.; SANTOS, A.R.; PORTELA, R.W.; SANTOS, R.L.; et al. Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: prevalence and management surveys. *Small Ruminant Research*, [S. l.], v. 87, n. 1–3, p. 86–91, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.09.017>

LEAL, K.S.; FERNANDES, M.; VALE, V.L.C.; ALMEIDA, S.C.; SANTOS, L.S.; ROCHA, L.S.; et al. Recombinant *M. bovis* BCG expressing the PLD protein promotes survival in mice challenged with a *C. pseudotuberculosis* virulent strain. *Vaccine*, [S. l.], v. 36, n. 25, p. 3578–3583, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.04.063>.

SHADNEZHAD, A.; NAEGELI, A.; COLLIN, M. CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* is an endo- β -N-acetylglucosaminidase. *BMC Microbiology*, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 261, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0882-3>