

AValiação de Extratos Lipídicos *IRIDEA CORDATA* OU *SACORPLETIS SKOTTIBERGII* COMO ADJUVANTES NA VACINAÇÃO COM rCP01850 CONTRA INFECÇÃO POR *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS*.

ISABELLE DE LEMOS SOARES¹; ESHILEY SHAIANE COSTA MENDES²;
NICOLE RAMOS SCHOLL²; TALLYSON NOGUEIRA BARBOSA²; GABRIELA
SANCHES DE AVILA²; SIBELE BORSUK³

¹Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTEc, UFPEL – isabelle-2407@hotmail.com

²Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTEc, UFPEL – eshiley.cmendes@gmail.com

²Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTEc, UFPEL –
nicolerammoscholl@hotmail.com

²Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTEc, UFPEL – tallyson_n_b@hotmail.com

²Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTEc,
ufpel-gabrielasanchessdeavila@gmail.com

³Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTEc, UFPEL – sibeleborsuk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Corynebacterium pseudotuberculosis, uma bactéria intracelular facultativa, é o agente causador da Linfadenite caseosa (LC), uma doença crônica que causa perdas econômicas significativas na ovinocaprinocultura (DORELLA et al. 2006). Devido à capacidade do patógeno de sobreviver dentro das células do sistema imune, ocorre a formação de granulomas que encapsulam as células infectadas, dificultando a ação de antibióticos (BASTOS et al. 2012). Dessa forma, o tratamento mais efetivo para o controle da doença é a vacinação, entretanto, as vacinas comercialmente disponíveis são insuficientes em oferecer uma proteção total e apresentam efeitos colaterais indesejados (PINHO et al. 2021).

No desenvolvimento de vacinas, a escolha do adjuvante adequado é fundamental para potencializar a ação do antígeno e melhorar a resposta imune. No entanto, os adjuvantes disponíveis atualmente têm capacidade imunogênica limitada, o que reforça a necessidade de novas alternativas para o desenvolvimento de vacinas mais eficientes (ZHAO et al. 2023). Diante disso, extratos naturais de algas marinhas se destacam como adjuvantes promissores em formulações vacinais, por conseguirem estimular uma resposta imune humoral (CUI et al. 2024, JABEEN et al. 2021).

Além da seleção do adjuvante, a escolha do tipo de antígeno associado a ele é um fator importante. Corroborando isso, o estudo de Brilhante Bezerra et al. (2020) demonstrou que a rCP08150, quando combinado com o adjuvante de própolis vermelha, induziu 70% de proteção em animais desafiados.

Assim, esse estudo buscou avaliar se os extratos lipídicos de *Iridea Codata* e *Sacorpletis skotibergii* utilizados como adjuvantes, em associação com a proteína recombinante CP01850 em uma vacina contra LC, na indução de uma resposta imune humoral em camundongos vacinados.

2. METODOLOGIA

Os extratos lipídicos utilizados das macroalgas *Iridea codata* e *Sacorpletis skotibergii* obtidas foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Lipidômica e Bio-Orgânica da Universidade Federal de Pelotas (UFPeL). Para se obter a

proteína recombinante CP01850, foi seguido a metodologia fornecida por (Rezende et al. 2020), adaptada por (BARBOSA et al. 2023). Sua expressão recombinante foi feita usando *Escherichia coli* BL21 STAR, através do plasmídeo recombinante pAE/cp01850, com indução por 1mM de isopropil - β - D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Logo depois da sua indução, sua cultura ficou em agitação por 3 horas a 37°C. Após sua expressão, a confirmação da sua identidade foi através do Western blot (WB), onde houve a utilização de um anticorpo monoclonal anti-6xHis conjugado a peroxidase (HRP).

A purificação da proteína aconteceu por cromatografia de afinidade de níquel com a coluna Sepharose (HisTrap, GE Healthcare). Posteriormente, foi realizada uma eletroforese em gel de SDS-PAGE a 12% para avaliação da sua pureza e sua concentração por meio do kit BCA (Pierce).

Para o ensaio de resposta imune humoral, utilizou-se 50 camundongos fêmeas BALB/C, com idade entre 6 e 8 semanas, fornecidos pelo Laboratório Central da UFPel, para o ensaio de imunização. Os camundongos foram divididos em 5 grupos com 10 animais em cada. Sua organização ocorreu da seguinte maneira: o Grupo 1 (G1) - solução salina a 0,9; Grupo 2 (G2) - rCP01850; Grupo 3 (G3) - rCP01850 + Saponina (adjuvante comercial); Grupo 4 (G4) - rCP01850 combinado com *Iridea codata* e Grupo 5 (G5) - rCP01850 combinado com *Sacorporletis skotibergii*. Cada grupo recebeu duas doses da vacina por via subcutânea com intervalo de 21 dias. Todas as doses foram administradas em um volume final de 200 μ L usando solução salina estéril (0,9 NaCl) como veículo. O sangue foi coletado pela veia submandibular, centrifugado a 1500 g por 15 minutos. O soro obtido foi então separado e armazenado a -20°C para análise dos anticorpos.

A realização de ELISA indireto com amostras de soro de camundongos imunizados possibilitou a caracterização da resposta imune humoral, com a medição de anticorpos IgG totais e os isótipos IgG1 e IgG2a contra a proteína alvo. Placas de poliestireno de 96 poços foram revestidas com 100 μ L tampão bicarbonato-carbonato a pH 9,8 contendo a proteína rCP01850 (100 ng/poço). Elas foram incubadas por 18 h a 4°C e lavadas com PBS-T (1X PBS, pH 7,4, 0,1% Tween 20) três vezes. Em seguida, as placas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado contendo PBS (200 μ L/poço) por 2 h a 37°C. Após isso, foram lavadas com PBS-T mais três vezes. Todas as amostras de soro de camundongo foram diluídas em PBS 1:50 e 100 μ L de cada amostra diluída foi adicionada nas placas em duplicata e incubadas por 1 h a 37°C. Depois de outra rodada de lavagem, foi adicionado nas placas 100 μ L/poço de IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) para detecção de IgG total. Para a detecção de IgG1 e IgG2a, foram adicionados 100 μ L/poço do anticorpo anti-IgG1 (diluído a 1:5000 em PBS-T) ou do anticorpo anti-IgG2a (diluído a 1:2000 em PBS-T). Após a incubação por 1 hora a 37 °C, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T. Em seguida, adicionou-se 100 μ L/poço de IgG anti-cabra conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich), diluída a 1:5.000 em PBS-T. Posteriormente, foram incubadas por 1h a 37°C e lavadas cinco vezes com PBS-T. Por último, foi adicionado 100 μ L/poço da solução de substrato-cromógeno contendo OPD nas placas, que foram incubadas em temperatura ambiente por 15 min. A reação foi interrompida com a adição de 50 μ L de H₂SO₄ por poço. A leitura foi então realizada em um leitor de placas ajustado para 492 nm.

O GraphPad Prism 5.0 foi utilizado para a análise dos dados, as diferenças nos níveis de IgG anti-rCP01850 foram analisadas pelo teste ANOVA unidirecional, e para comparações múltiplas utilizou-se o teste de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a obtenção da proteína recombinante CP01850, sua identidade foi confirmada por Western blotting utilizando anticorpos monoclonais anti-6xHis e sua visualização esperada em uma banda com o tamanho de aproximadamente 33,5 kDa conforme observado na figura 1.

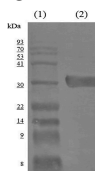


Fig. 1. Confirmação da expressão da proteína rCP01850 em *E.coli* por Western blotting com anticorpo monoclonal anti-6xHis (Mab). Poço: (1) marcador pré-corado e (2) rCP01850. A proteína rCP01850 é representada pela banda reativa com 33,5 kDa.

Os resultados apresentados nas figuras 2A, 2B e 2C demonstraram um aumento significativo nos níveis de IgG total, IgG1 e IgG2 anti-rCP01850 após o dia 42 nos grupos G4 e G5, em comparação com os demais grupos. No entanto, no G2, não foram observadas diferenças significativas em relação ao controle. Por outro lado, o G3 exibiu um aumento na produção de anticorpos, porém em níveis inferiores aos registrados em G4 e G5.

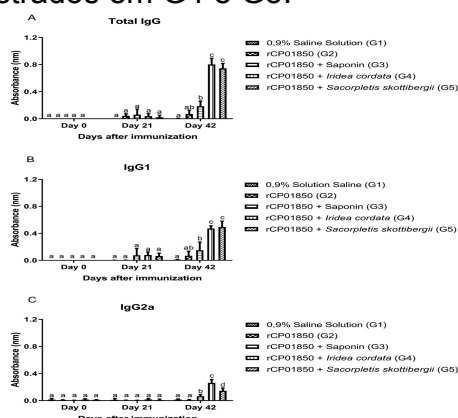


Fig. 2. Níveis de produção de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a em camundongos BALB/c imunizados com a proteína recombinante rCP01850 de *C. pseudotuberculosis* associada aos extratos lipídicos de *I. cordata* e *S. skottbergii*. A: níveis de IgG total específica para anti-rCP01850; B: níveis de IgG1 específica para anti-rCP01850; e C: níveis de IgG2a específica para anti-rCP01850.

Este estudo avaliou o potencial imunomodulador de extratos lipídicos de algas marinhas como adjuvantes em uma vacina recombinante contra a LC. A escolha desse adjuvante alternativo baseia-se no potencial imunestimulador de algas, conforme demonstrado por AROKIARAJAN et al. (2022), que destacou como uma alternativa promissora para o controle de doenças com tratamentos ineficazes. Os extratos lipídicos de algas (grupos G4 e G5) induziram uma resposta humoral robusta, com níveis elevados de IgG total e IgG1 superiores aos dos demais grupos. Tais resultados corroboram os achados de Bezerra e colaboradores (2020), que mostraram que uma vacina formulada com própolis vermelha como adjuvante foi capaz de conferir 70% de proteção. O G4, em particular, demonstrou um aumento expressivo de IgG2a após a segunda dose, reforçando a noção de que diferentes adjuvantes modulam distintamente a

resposta imune a um mesmo antígeno, conforme discutido por PINHO et al. (2021). Em contrapartida, o grupo com o adjuvante comercial (G3), apesar de uma produção notável de IgG total, teve uma resposta inferior aos grupos G4 e G5. Este resultado é consistente com o estudo de Rezende et al. (2020), que demonstrou a eficácia limitada de outro adjuvante comercial muito utilizado, o hidróxido de alumínio, em conferir proteção contra o desafio com a cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis* quando associado ao rCP01850.

4. CONCLUSÕES

Diante de uma eficácia reduzida das formulações vacinais tradicionais, os extratos lipídicos das macroalgas *Irídea cordata* e *Sacorpletis skottsbergii* surgem como uma solução promissora. Os resultados deste estudo demonstram que a associação desses extratos naturais com a proteína recombinante rCP01850 de *C. pseudotuberculosis* não apenas conferiu propriedades imunoestimuladoras relevantes, mas superou significativamente a resposta imune humoral obtida com a formulação convencional utilizando o adjuvante comercial, induzindo uma proteção mais robusta em modelo murino contra a linfadenite caseosa. Portanto, a incorporação desses extratos em formulações vacinais abrem novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias vacinais mais eficazes no controle da linfadenite caseosa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DE PINHO, R.B., DE OLIVEIRA SILVA, MT, BEZERRA, FSB *et al.* Vaccines for caseous lymphadenitis: up-to-date and forward-looking strategies. **Appl Microbiol Biotechnol** 105 , 2287–2296 (2021).
- 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. **IIOABJ**. 2011, 2, 33–43.
- DORELLA, FA; PACHECO, LGC; OLIVEIRA, SC; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium* Pathogenesis and 37,201–218. *Pseudotuberculosis: Molecular Studies Microbiology, Biochemical Properties, Virulence*. **Veterinary Research**. 2006.
- BRILHANTE BEZERRA FS, DE SILVA REZENDE A, F, OLIVEIRA SILVA MT de, et al. The combination of Brazilian red propolis and recombinant protein rCP01850 in the immunoprophylaxis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Vaccine** 2020, 149, 104-354.
- CUI, X.; WANG, Y.; MAQBOOL, B.; YUAN, L.; HE, S.; ZHANG, C.; XU, W.; HU, S. Early IgG Response to Foot and Mouth Disease Vaccine Formulated with a Vegetable Oil Adjuvant. **Vaccines** 2019 , 7 , 143.
- ZHAO, T., CAI, Y., JIANG, Y. et al. Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms. **Sig Transduct Target Ther** 8 , 283 (2023).
- JABEEN, M.; DUTOT, M.; FAGON, R.; VERRIER, B.; MONGE, C. Seaweed Sulfated Polysaccharides against Respiratory Viral Infections. **Pharmaceutics** 2021 , 13 , 733.
- AROKIARAJAN MS, THIRUNAVUKKARASU R, JOSEPH J, EKATERINA O, ARUNI W. Advance research in biomedical applications on marine sulfated polysaccharide. **Int J Biol Macromol**. 2022, 194, 870–881.