

BACTERINA DE *ESCHERICHIA COLI* RECOMBINANTE EXPRESSANDO FOSFOLIPASE D CONTRA LINFADENITE CASEOSA

ESHILEY SHAIANE COSTA MENDES¹; ISABELLE DE LEMOS SOARES²; FELIPE RIBEIRO GASTAL²; MÔNICA ELLEN DA COSTA SOARES²; LUIZA DOMINGUES MORON²; SIBELE BORSUK³

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

²Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPel – isabelle-2407@hotmail.com

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

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

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

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

1. DESCRIÇÃO DA INOVAÇÃO

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença infecciosa, causada pelo patógeno intracelular facultativo *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que acomete principalmente pequenos ruminantes, como caprinos e ovinos, sendo caracterizada pelo surgimento de abscessos nos linfonodos (BAIRD; FONTAINE, 2007). Na forma intracelular, *C.pseudotuberculosis* encontra-se envolto por uma espessa camada de material caseoso, o que dificulta a ação dos antibióticos e compromete a eficácia do tratamento (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). Embora a vacinação represente a estratégia mais promissora para o controle da doença, ainda não existem imunizantes comercialmente disponíveis que proporcionem proteção eficaz contra o patógeno (DE PINHO et al., 2021).

A vacina recombinante inativada de *Escherichia coli* (bacterina) contra a linfadenite caseosa, emprega tecnologia de DNA recombinante para que a *E. coli* expresse a fosfolipase D (PLD), considerada o principal fator de virulência e o antígeno mais promissor para induzir uma resposta imune protetora, conforme descrito por DORELLA e colaboradores (2007). Ao contrário das vacinas tradicionais, como as toxóides, esta abordagem inovadora oferece maior segurança, pois utiliza uma cepa não patogênica de *E. coli*, que é inativada após a produção do antígeno, eliminando qualquer risco de proliferação bacteriana ou de infecção nos animais.

A inovação deste produto está na combinação de tecnologia recombinante com o uso direto da bactéria inativada, o que permite uma produção mais simples, estável e econômica, sem comprometer a eficácia imunológica. Essa abordagem reduz etapas complexas de purificação e oferece uma alternativa prática e acessível para o controle da linfadenite caseosa, atendendo às demandas do setor agropecuário por soluções vacinais mais eficientes.

2. ANÁLISE DE MERCADO

O público-alvo para a vacina recombinante contra a linfadenite caseosa é composto principalmente por produtores de ovinos e caprinos, veterinários e empresas de sanidade animal que atuam na prevenção de doenças em rebanhos. Deste modo, estima-se que a linfadenite caseosa (LC) cause perdas econômicas diretas e indiretas superiores a US\$ 70 milhões por ano no Brasil, considerando descarte de carcaças, queda de produtividade, tratamentos paliativos e restrições comerciais (Dorella et al., 2006; Guimarães et al., 2011). Além das perdas financeiras, a LC compromete a capacidade produtiva dos animais, com impacto mundial equivalente à perda de mais de 1 milhão de animais comercializáveis anualmente, entre abates precoces e descartes por lesões incompatíveis com o consumo (Mendes et al., 2023).

O mercado de vacinas veterinárias para pequenos ruminantes é competitivo, com presença de empresas nacionais e internacionais como Zoetis, Boehringer Ingelheim, MSD Saúde Animal e Elanco, que oferecem produtos tradicionais como bacterinas convencionais e vacinas de subunidade. Contudo, a nossa vacina se diferencia por utilizar tecnologia recombinante com bactéria inativada, permitindo produção simplificada, maior segurança e redução de custos, sem necessidade de manipular patógenos vivos, características altamente valorizadas pelos produtores.

O mercado de saúde veterinária no Brasil apresentou movimentação superior a R\$10 bilhões em 2023, com previsão de crescimento, especialmente no segmento de vacinas (SINDAN, 2023). Considerando a prevalência da linfadenite caseosa e o impacto econômico da doença, o potencial de mercado para a nossa vacina é elevado, especialmente em regiões com alta incidência da doença, onde soluções inovadoras e de baixo custo podem gerar benefícios significativos para a saúde animal e para a economia rural.

3. ESTRATÉGIA DE DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO

A bacterina recombinante de *Escherichia coli* expressando a fosfolipase D (PLD) de *Corynebacterium pseudotuberculosis* possui patente registrada no INPI (BR1020200054228), garantindo a originalidade e a proteção intelectual da tecnologia. O processo de desenvolvimento iniciou-se com a construção de um plasmídeo contendo o gene *pld*, responsável pela produção da PLD, seguido da transformação em *E. coli* STAR BL21. Após a indução da expressão, a cultura bacteriana foi submetida à inativação química com formaldeído, assegurando a eliminação da viabilidade celular e a manutenção dos antígenos de interesse.

Para avaliar a capacidade imunogênica da formulação, foram realizados ensaios de imunização em camundongos. Os animais receberam doses da bacterina associada a um adjuvante de saponina e tiveram amostras sanguíneas coletadas em diferentes intervalos. A resposta imune celular foi monitorada a partir da dosagem de citocinas, como o interferon-gama (IFN- γ), marcador clássico de ativação da via Th1, além da análise de interleucinas regulatórias, a fim de caracterizar o perfil da resposta induzida.

A proteção conferida pela bacterina foi verificada por meio de desafio experimental, no qual os animais imunizados foram expostos a uma cepa virulenta de *C.pseudotuberculosis* MIC-6. O acompanhamento incluiu monitoramento clínico e avaliação da sobrevivência dos grupos experimentais em comparação com controles, de modo a determinar a capacidade da formulação em conferir imunidade frente à infecção.

Com base nesses dados, nossa tecnologia está quase em um estágio de desenvolvimento intermediário (nível 4 de maturidade tecnológica). No entanto, ainda não foram realizados testes em animais-alvo (ovinos e caprinos) ou em condições de campo, necessários para avançar para níveis superiores de maturidade tecnológica. As etapas seguintes incluem avaliação da eficácia em animais de produção, ajustes de formulação com possíveis antígenos complementares, estudos em condições reais de criação e definição de protocolos de escalonamento produtivo.

Os principais desafios e riscos relacionados à implementação incluem a eficácia parcial observada até o momento, a necessidade de validar a resposta imune em espécies-alvo, as exigências regulatórias para registro comercial e a aceitação do mercado, que já dispõe de vacinas tradicionais embora de eficácia limitada. Para mitigar tais riscos, planeja-se o desenvolvimento de formulações combinadas para ampliar a proteção, manutenção rigorosa de protocolos de biossegurança no processo de inativação, interação com órgãos reguladores para alinhamento técnico e normativo, além da exploração estratégica da patente como diferencial competitivo frente à concorrência.

4. RESULTADOS ESPERADOS E IMPACTO

A vacina de bacterina recombinante de *E. coli* tem como objetivo causar um impacto significativo na ovinocaprinocultura, especialmente na prevenção da linfadenite caseosa (LC). Espera-se desenvolver uma vacina eficaz para pequenos ruminantes, pronta para avaliação clínica e, após aprovação, para comercialização no Brasil, garantindo independência tecnológica e fortalecendo a ciência nacional. Do ponto de vista econômico, a vacina deve reduzir perdas na produção de carne, leite e pele, diminuir gastos com antibióticos caros e pouco eficazes, aumentar a competitividade da ovinocaprinocultura brasileira, no mercado internacional e impulsionar o setor de biotecnologia, gerando oportunidades para novos negócios e pesquisas. No aspecto social, o projeto contribui para a geração de empregos qualificados, capacitação em biotecnologia, apoio a pequenos produtores rurais, aumento da segurança econômica e melhoria da qualidade de vida, além de reduzir o risco de exposição humana à bactéria, promovendo benefícios à saúde pública. Em termos ambientais, espera-se menor uso de antibióticos, contribuindo para o combate à resistência bacteriana, produção animal mais saudável e sustentável, e um processo industrial com menos resíduos e menor impacto ambiental. A visão de futuro da tecnologia prevê o desenvolvimento de uma plataforma vacinal versátil, capaz de gerar vacinas multivalentes e escalonáveis industrialmente, com expansão nacional e internacional, fortalecendo tanto a saúde animal quanto o setor biotecnológico brasileiro. Ademais, o presente estudo demonstrou que a bacterina recombinante de *E. coli* expressando a fosfolipase D apresenta perfil de segurança, capaz de induzir uma proteção de até 40% contra a linfadenite caseosa em modelo murino, configurando-se como uma estratégia promissora para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes e economicamente viáveis.

5. CONCLUSÕES

A inovação proposta, uma vacina recombinante contra a Linfadenite Caseosa, tem potencial para impactar positivamente a ovinocaprinocultura, oferecendo uma alternativa eficaz para a prevenção da linfadenite caseosa. Por meio de estratégias biotecnológicas avançadas, a proposta busca disponibilizar um produto inovador que beneficiará não apenas os produtores, mas também o bem-estar animal e a qualidade de vida no campo. O cenário do mercado de vacinas recombinantes é promissor, com previsões de crescimento contínuo, favorecendo a inserção dessa tecnologia. Espera-se que a vacina gere impactos significativos, desde o aumento da sustentabilidade e saúde dos rebanhos até a elevação da segurança alimentar e da rentabilidade dos pecuaristas.

6. 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.