

## EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES COM POTENCIAL IMUNOGÊNICO CONTRA *RHODOCOCCUS EQUI*

OTÁVIO JOSÉ PINTO DO NASCIMENTO<sup>1</sup>; PEDRO HENRIQUE DALA NORA QUATRIN<sup>2</sup>; ISABELA BOLDRINI DUTRA RASCH<sup>3</sup>; STEFANIE BRESSAN WALLER<sup>4</sup>, MARCOS ROBERTO ALVES FERREIRA<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas - UFPEL – [Otavio.uf@gmail.com](mailto:Otavio.uf@gmail.com) 1

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas - UFPEL – [quatrinp@gmail.com](mailto:quatrinp@gmail.com) 2

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas - UFPEL – [boldrinirasch@gmail.com](mailto:boldrinirasch@gmail.com) 3

<sup>4</sup>Helper Pesquisa e Desenvolvimento em Imunobiológicos – [stefanie.waller@helper.bio.br](mailto:stefanie.waller@helper.bio.br) 4

<sup>5</sup>Helper Pesquisa e Desenvolvimento em Imunobiológicos – [marcos.ferreira@helper.bio.br](mailto:marcos.ferreira@helper.bio.br) 5

### 1. INTRODUÇÃO

A rodococose equina é uma enfermidade respiratória grave que afeta potros jovens, sendo o patógeno intracelular *Rhodococcus equi* (também conhecido como *Prescotella equi*) o agente etiológico (PRESCOTT, 1991). Esta bactéria Gram-positiva, amplamente distribuída no ambiente, é um habitante natural do solo e se prolifera em fezes de equinos e outros herbívoros (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2009). A infecção ocorre principalmente por inalação de aerossóis contendo o patógeno, que se aloja nos alvéolos pulmonares e desencadeia o processo infeccioso. Embora seja um microrganismo onipresente, *R. equi* causa doença em cavalos, principalmente potros, e de forma oportunista em humanos imunossuprimidos (MUSCATELLO et al., 2007).

A patogenia da rodococose está intrinsecamente ligada à capacidade de *R. equi* de sobreviver e se replicar dentro dos macrófagos alveolares. A bactéria é internalizada por fagocitose, mas consegue evitar a destruição intracelular e se multiplicar, levando à necrose celular e à formação de grandes abscessos pulmonares (MUSCATELLO, 2007). A suscetibilidade dos potros à doença se deve à imaturidade de seu sistema imunológico, que não consegue montar uma resposta eficaz contra o patógeno intracelular. A doença afeta potros com idade entre 3 semanas e 5 meses, período em que a imunidade materna passiva está em declínio e a imunidade ativa do potro ainda não está totalmente desenvolvida. A alta morbidade e mortalidade associadas à rodococose representam um desafio significativo para a indústria equina (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997).

O controle da rodococose é um desafio histórico tendo as estratégias tradicionais, como o soro hiperimune que fornecem imunidade passiva, mas sua eficácia é variável e não previne totalmente a infecção. A vacina de bacterina de *R. equi* inativado, feita de bactérias mortas, também tem sua eficácia questionada por induzir uma resposta imunológica humoral, que não é a mais indicada para combater um patógeno intracelular (HOOPER-MCGREVY; GIGUÈRE, 2011). Sendo a rodococose equina uma doença grave, em resposta às limitações das vacinas atuais, a pesquisa se concentra em vacinas recombinantes que usam antígenos específicos de *Rhodococcus equi*. Esses antígenos são cruciais para a virulência da bactéria, tornando-os alvos ideais. Este trabalho foca na expressão e caracterização desses antígenos para criar um protótipo de vacina de subunidade, buscando uma solução mais segura e eficaz para a saúde animal e a indústria equina.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Transformação e expressão das proteínas recombinantes

*Escherichia coli* BL21 (DE3) Star foi transformada mediante choque térmico para inserção do vetor plasmidial (pET28a) que foi adquirido comercialmente da Epoch Life science contendo o gene de interesse, conforme descrito por Green and Sambrook (2012). Brevemente, as células transformadas de *E. coli* foram cultivadas em 10 mL de meio Luria-Bertani (LB) suplementado com 100 mM canamicina e incubadas em agitador orbital (16h, 37 °C, 180 RPM).

Após, 5 mL do cultivo foi transferido para 100 mL de LB com 100 mM canamicina e incubado nas mesmas condições até atingir a densidade óptica ( $DO_{600nm}$ ) de 0,8 – 1,0 para indução da expressão da proteína recombinante pela adição de 0,5 mM isopropil-β-D-1-tiogalactopiranose (IPTG) por 3 h (37 °C, 180 RPM).

### 2.2 Processamento dos cultivos e avaliação da solubilidade

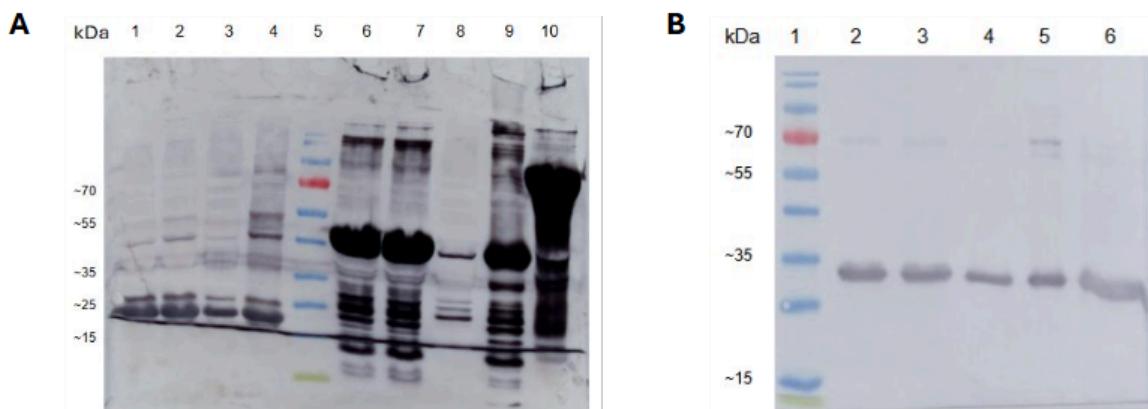
Após a expressão da proteína recombinante, o cultivo foi centrifugado (7.000 RPM, 5 min) e o *pellet* suspenso em 10 mL de tampão de lavagem contendo 100 mM lisozima e incubado em agitação por 1h a 37°C. Após a lise enzimática, os cultivos foram submetidos ao processo de ultrassonicação (60 KHz, 6 ciclos de 15 segundos) e centrifugadas (10.000 RPM, 10 min, 4 °C) para separação das frações celulares solúveis (sobrenadante do lisado celular) e insolúveis (*pellet*).

O *pellet* celular, contendo os corpos de inclusão, foi suspenso em 10 mL de tampão de lavagem contendo 8M Uréia para desnaturação e solubilização da proteína e incubado sob agitação lenta (16h, 4 °C). Ao final dessa etapa, a amostra foi centrifugada (10.000 RPM, 20 min, 4 °C) e o sobrenadante coletado para avaliação por SDS-PAGE e *Western blot*.

Amostras de cultivo não induzido e induzido 3 h com IPTG, bem como do sobrenadante do lisado celular (solúvel) e dos corpos de inclusão (insolúvel) foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%. Para o *Western Blot*, foram aplicadas as mesmas amostras avaliadas por SDS-PAGE em outro gel e transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando o TransBlot Turbo Transfer System (Bio-Rad, EUA) a 25 V por 20 minutos. A membrana contendo as proteínas foi incubada em tampão de bloqueio (PBS-T + 5% de leite em pó desnatado) durante 1 h. Após a etapa de bloqueio, a membrana foi lavada com PBS-T e incubada com anticorpo anti-6xhis conjugado a HRP (ThermoFisher, EUA) diluído 1:10.000 em PBS-T e mantido sob agitação por 1 h, seguido de uma etapa de lavagem com PBS-T e revelação da reação por DAB (Tris HCl 50 mM pH 7,6; solução de níquel 0,03%; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 3,3'-diaminobenzidine).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisamos a expressão dos抗ígenos recombinantes (Ag1, Ag2 e Ag3) por Western blot (Figura 1). O método confirmou a produção das proteínas-alvo, já que bandas correspondentes aos抗ígenos apareceram nos extratos celulares induzidos. A presença das bandas na análise demonstrou a expressão dos抗ígenos com seus tamanhos moleculares esperados.



**Figura 1: Avaliação da expressão e caracterização por *Western blot* dos extratos celulares e das frações solúvel e insolúvel dos抗ígenos recombinantes (Ag1, Ag2 e Ag3).** **A:** 1 - Extrato celular não induzido do Ag1; 2 - Extrato celular induzido do Ag1; 3 - Fração solúvel do Ag1; 4 - Fração insolúvel do Ag1; 5 - Marcador; 6 - Extrato celular não induzido do Ag2; 7 - Extrato celular induzido do Ag2; 8 - Fração solúvel do Ag2; 9 - Fração insolúvel do Ag2; 10 - Controle positivo (proteína recombinante purificada). **B:** 1 - Marcador; 2 - Extrato celular não induzido do Ag3; 3 - Extrato celular induzido do Ag3; 4 - Fração solúvel do Ag3; 5 - Fração insolúvel do Ag3; 6 - Controle positivo (proteína recombinante purificada).

Analisamos a expressão dos抗ígenos, que foram encontrados principalmente na fração insolúvel, formando corpos de inclusão. O Ag1 e Ag2 foram majoritariamente insolúveis, com pouca presença na fração solúvel (Figura 1A, colunas 3, 4, 8, e 9). O Ag3 também se mostrou quase totalmente insolúvel (Figura 1B, coluna 5). A identidade dos três抗ígenos foi confirmada por Western blot, e seu tamanho correspondeu ao dos controles positivos.

A expressão de抗ígenos de *R. equi* como corpos de inclusão é comum em sistemas heterólogos (CARDOSO, 2013). O foco em proteínas de virulência, como VapA e VapC, é promissor. Essas proteínas são cruciais para a sobrevivência da bactéria em macrófagos, tornando-as ideais para uma resposta imune direcionada (BYRNE, 2001; LETEK, 2008). A patogenicidade de *R. equi* depende do plasmídeo que codifica as proteínas Vap (TREVISANI, 2017; VALERO-RELLÓ, 2015), e estudos recentes confirmam seu papel central na infecção (MIRANDA-CASO LUENGOS, 2024). Vacinas baseadas em bacterinas inativadas geram uma resposta imune limitada e apresentam risco de inativação incompleta (RAO et al., 2012; PAGANELLI et al., 2019). Por outro lado, o uso de proteínas recombinantes é significativamente mais seguro, pois o抗ígeno não pode causar a doença (PAGANELLI et al., 2019). As próximas etapas incluem a otimização da solubilização e refold dos抗ígenos, seguida pela purificação e caracterização imunológica.

#### 4. CONCLUSÕES

Neste trabalho, expressamos com sucesso três抗ígenos recombinantes de *Rhodococcus equi* (Ag1, Ag2 e Ag3). A produção e caracterização desses componentes são um passo significativo, confirmando seu potencial para o desenvolvimento de um protótipo vacinal contra a rodococose equina. Apesar de terem se acumulado em forma insolúvel, a pesquisa abre caminho para

otimizações futuras na purificação. Isso representa um avanço em relação às vacinas tradicionais, baseadas em bactérias inativadas, pavimentando o caminho para uma vacina mais segura, pura e eficaz para a saúde equina.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARDOSO, T. C. et al. Protection of foals against *Rhodococcus equi* by passive transfer of plasma from mares immunized with a VapA-based subunit vaccine. **Vaccine**, v. 31, n. 40, p. 4443-4449, 2013.
- GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F. *Rhodococcus equi* pneumonia in foals: A review of the disease and its management. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, n. 4, p. 241-250, 1997.
- HOOPER-MCGREVY, T. S. E. D. R. E.; GIGUÈRE, S. Current status of vaccine development for *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 227, p. 1-8, 2011.
- LETEK, M. et al. The genetic basis of virulence in *Rhodococcus equi* is a large plasmid encoding a novel regulon. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 12, p. 4141-4151, 2008.
- MIRANDA-CASO LUENGOS, S. et al. Development and validation of a multiplex bead-based assay for the detection of VapA-, VapC-, and VapD-specific antibodies in foals. **PLoS ONE**, v. 19, n. 2, p. e0298900, 2024.
- MUSCATELLO, G. et al. Rhodococcus equi infection in foals: the science of 'rattles'. **Equine Veterinary Journal**, v. 39, n. 5, p. 470-478, 2007.
- MUSCATELLO, G. Rhodococcus equi infection in foals: Pathogenesis, diagnosis, and treatment. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 35, n. 1, p. 1-13, 2019.
- PAGANELLI, P. et al. Recombinant vaccines: moving from the laboratory to the field. **Vaccine**, v. 37, n. 47, p. 7056–7067, 2019.
- PRESCOTT, J. F. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 1, p. 20-34, 1991.
- RAO, M. et al. Vaccine production, safety and quality control. In: **Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Protocols**. New York, NY: Springer New York, 2012. p. 1–25.
- TREVISANI, M. et al. The diversity and evolution of the virulence plasmid of *Rhodococcus equi*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 857, 2017.
- VALERO-RELLO, J. F. et al. The VapC protein is a key virulence factor of *Rhodococcus equi* that regulates the expression of the VapA protein. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 8, p. 3314-3323, 2015.
- VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. et al. Havemeyer workshop report: *Rhodococcus equi* comes of age. **Equine Veterinary Journal**, v. 41, n. 1, p. 93-95, 2009.