

CONSTRUÇÃO DE VACINAS DE SUBUNIDADES RECOMBINANTES PARA O CONTROLE DA LINFADENITE CASEOSA

BRAITE C. Drielly¹, DE PAULA C. Gabriela¹, RODRIGUES C. Suelen¹, AZEVEDO Vasco², DELLAGOSTIN Odir¹ SMIONATTO Simone³ e BORSUK Sibeles¹

¹Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia, UFPel, ²Departamento de Biologia Geral, UFMG, ³Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, UFGD.
driellybraite@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

A Linfadenite Caseosa (LC), causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, é uma enfermidade crônica que causa patologias severas e acomete ovinos e caprinos em todo o mundo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais, ocasionando grandes perdas econômicas (Pekelder et al., 2000). A LC é também conhecida por “Mal do Carvão” ou “Falsa Tuberculose” (Veschi et al., 2005) e tem por agente etiológico a bactéria Gram positiva, não esporulada, aeróbica facultativa e parasita intracelular facultativa de macrófagos (Anderson et al., 2005).

É uma doença de fácil transmissão, já que a introdução de animais infectados compromete um rebanho sadio (Pekelder et al., 2000; Sobrinho et al., 2001). O tratamento da LC por meio de vacinas inativas/mortas apresenta elevado custo e não possui resultados satisfatórios, uma vez que o agente bacteriano age dentro da célula (Barakat et al., 1974; Bladen et al., 1969). Todavia, as vacinas recombinantes são uma alternativa para uma imunoproteção mais eficaz, pois usam somente os fragmentos antigênicos de um microrganismo o que melhor estimulam em uma resposta imune, possibilitando assim, em menor risco, produção em larga escala e custo menor de produção (Burrell et al., 1983).

A ovinocaprinocultura no Brasil possui grande importância nas áreas social e econômica, já que é tradicionalmente destinada à produção de lã, seguida pela produção de carne (Seyffert et al., 2009). Apesar da importância deste rebanho para a região sul do país, ainda não existe uma vacina nacional que seja eficaz contra LC. Desta maneira, se torna necessária a busca pelo desenvolvimento de medidas profiláticas que visam o controle efetivo desta enfermidade. Mediante a este problema, um dos nossos objetivos foi à utilização do gene Cp1002_0369, o qual codifica para uma provável lipase (CP1002_0369) potencialmente antigênica, com o propósito de serem utilizadas no desenvolvimento de vacinas recombinantes.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Para a construção do vetor de expressão em *Escherichia coli* o gene Cp1002_0369 de *C. pseudotuberculosis* será amplificado por PCR utilizando os primers F5' CGGGGATCC CAGCCAGTGCTTCAGGTC e R5' CCCAAGCTTTTATTTTTGTACCGCTTGCTC. O gene foi digerido com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III e, posteriormente, ligado ao vetor pAE e digerido com as mesmas enzimas com o auxílio da enzima T4 DNA ligase. O produto da ligação foi transformado por eletroporação em células de *E. coli* Top10. Os clones recombinantes foram caracterizados enzimaticamente e foi realizado sequenciamento de DNA.

Um clone recombinante - pAE/Cp1002_0369 - foi utilizado para a transformação da cepa de expressão *E. coli* BL21 Star. A detecção da expressão da proteína, bem como sua pureza, foi observada através de um SDS-PAGE e por Western Blot utilizando o anticorpo monoclonal anti-6Xhistag (Sigma). A purificação será realizada por cromatografia de afinidade em coluna de sepharose (HisTrap™), carregada com níquel.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um fragmento de 900pb, correspondente ao gene Cp1002_0369 foi amplificado por PCR (Fig. 01) e ligado ao vetor de expressão pAE - pAE/0369. Foi realizado o seqüenciamento de DNA e este foi caracterizado enzimaticamente.



Figura 01: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR. (1) Marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). (2): Gene Cp1002_0369.

A Expressão da proteína recombinante r0369 foi verificada em diferentes testes de expressão de *E. coli* como pLysS, Star e RIL, através de SDS-PAGE e de *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-his6xtag (Fig. 02). Como pode ser observado na figura abaixo, a proteína foi expressa e a identidade foi confirmada pela reação positiva com o anticorpo monoclonal anti-his6Xtag, já que a cauda de histidina e a proteína recombinante foram expressas. Verificou-se ainda por meio do teste de solubilidade que a proteína é expressa na fração insolúvel, portanto, esta deve ser purificada utilizando agentes desnaturantes nos tampões de purificação. A proteína purificada será utilizada para a imunização de camundongos com a finalidade de avaliar o seu potencial de proteção.

Bactérias atenuadas ou inativadas, ou frações contendo antígenos da parede da bactéria ou do sobrenadante de cultura bacteriana e ainda uma mistura de componentes celulares e sobrenadante podem ser usados como vacinas para LC (Dorella *et al.*, 2009), contudo, estas preparações apresentaram níveis de proteção e de severidade das lesões variáveis e pouco eficientes. Vacinas DNA também já foram utilizadas (Babiuk *et al.*, 2000). A proteína 0369 é uma lipase descrita com potencial antigênico através de análises com soros de animais positivos para LC, portanto, é um bom alvo para o desenvolvimento de uma vacina para esta doença.



Figura 02: *Western blotting* da expressão da proteína recombinante 0369r expressa na cepa *E. coli* RIL. (1): *E. coli* RIL transformada com o vetor pAE/0369, (2) Controle Negativo, cepa de *E. coli* RIL não transformada controle, (3): LipL32 recombinante purificada.

4 CONCLUSÃO

A proteína 0369r foi expressa com êxito na cepa de *E. coli* RIL, e esta será purificada, e posteriormente, utilizada para imunização de camundongos, com a finalidade de avaliar o potencial imunogênico desta vacina de subunidade recombinante para o controle da linfadenite caseosa.

5 REFERÊNCIAS

- ANDERSON, D. E.; RINGS, D. M.; PUGH, D. G. *Enfermidades do sistema tegumentar*. In: PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2005.
- BABIUK, L.A., BABIUK, S.L., LOEHR, B.I., VAN DRUNNEN LITTEL-VAN DEN HUR. 2000. Nucleic acid vaccines: research tool or commercial reality. *Vet Immunol Immunopathol.* 76, 1-23.
- BARAKAT, A.A.; SABER, M.S.; AWAD, H.H. Immunization studies on *C. ovis* infection in guinea pigs by use of BCG and heat killed *C. ovis* vaccine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, n.34, p.38-46, 1974.
- BLADEN, R.V.; LEFFORD, M.T.; MACHNAERS, G.B. The host reponse to BCG infection in mice. *J. Exp. Med.*, n.129, p.1079-1106, 1969.
- BURREL, D.H. 1983. **Caseous lymphadenitis vaccine**. *N. S. W. Vet. Proc.* 19, 53-57.
- DORELLA, F.A., PACHECO, L.G.C., SEYFFERT, N., PORTELA, R.W., MEYER, R., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V. 2009. Antigenes of ***Corynebacterium pseudotuberculosis*** and prospects for vaccine development. *Expert Review of Vaccines.* 8, 205-213.

PEKELDER, J. J. **Caseous lymphadenitis**. In: MARTIN, W. B.; AITEKEN, I. D. Diseases of Sheep. 3. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2000. p. 270-274.

SEYFFERT, N., GUIMARÃES, A.S., PACHECO, L.G.C., PORTELA, R.W., BASTOS, B.L., DORELLA, F.A., HEINEMANN, M.B., LAGE, A.P., GOUVEIA, A.M.G., MEYER, R., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V. 2009. High seroprevalence of **caseous lymphadenitis** in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. 81, 50-55.

SOBRINHO, A. G. S. Principais Enfermidades dos Ovinos. In: Criação de ovinos. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2001. p.220-221.

VESCHI, J.L. **Linfadenite Caseosa**. In: VII ENCONTRO DE CAPRINOCULTORES DO SUL DE MINAS E MÉDIA MOGIANA, 2005, Espírito Santo do Pinhal. Anais. Disponível em <http://www.caprtec.com.br/pdf/cabras_homeopatia.pdf>. Acesso em 18/08/2011.