

CONSTRUÇÃO DE VACINA DE SUBUNIDADE RECOMBINANTE PARA LINFADENITE CASEOSA UTILIZANDO O GENE *cp1802* DE *Corynebacterium pseudotuberculosis*

DE PAULA, Gabriela Cristina¹; BRAITE, Drielly C.1; RODRIGUES, Suelen C.1; BORSUK, Sibeles¹; DELLAGOSTIN, Odir¹; AZEVEDO, Vasco² e SMIONATTO, Simone³

¹Universidade Federal de Pelotas/Centro De Desenvolvimento Tecnológico – CDTEC/Núcleo de Biotecnologia/Laboratório de Biologia Molecular; ²Departamento de Biologia Geral, UFMG, ³Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, UFGD. biba_arq@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

A Linfadenite Caseosa (LC) é uma enfermidade crônica, infecto-contagiosa, também conhecida como “Falsa Tuberculose” ou “Mal do Carvão”, cujo agente etiológico é a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, classificada como gram-positiva, não esporulada, aeróbica facultativa e parasita intracelular (Pascual, 1995). Os principais sintomas que caracteriza essa doença são lesões purulentas e caseosas nos gânglios linfáticos, e ocasionalmente pulmões, baço, rins e fígado dos animais.

A LC acomete principalmente bovinos e caprinos, sendo responsável por perdas econômicas significativas na ovinocaprinocultura em diversos países do mundo (Pepin et al., 1999; Paule et al., 2003) incluindo o Brasil (Correa e Correa, 1992), que ocupa a 8ª posição em criação de ovinos e caprinos no mundo. O rebanho ovino na região sul detém 28% do rebanho efetivo brasileiro, e no estado do Rio Grande do Sul é onde se concentra a maior parte do rebanho com cerca de 4 milhões de cabeças de animais distribuídos principalmente no sul do estado (IBGE, 2007). Dessa forma, faz-se necessário o controle e a prevenção de doenças infecciosas, como a LC, a fim de evitar a transmissão para rebanhos de diferentes regiões do Brasil.

A melhor medida para a erradicação da doença seria a imunização, já que o tratamento para LC possui alto custo e muitas vezes é ineficaz. Muitos estudos têm sido testados e alguns inclusive oferecem certo grau de proteção, porém os níveis de proteção e a severidade das lesões são variáveis. Portanto, ainda não há uma vacina eficiente e com alto grau de proteção contra a *C. pseudotuberculosis*.

Vacinas recombinantes e vacinas de DNA em caprinos e ovinos são uma alternativa para uma imunoproteção mais eficaz, de baixo custo de produção, pois são usados somente os fragmentos antigênicos de um microrganismo, estimulando uma resposta imune que não oferece riscos aos animais, possibilitando, assim, uma produção em maior escala e com melhor custo-benefício.

Vários estudos demonstraram a imunoproteção contra várias doenças infecciosas utilizando vacinas recombinantes (Michelon et al., 2003; Simionatto et al., 2005; Seixas et al., 2007; Simionatto et al., 2010). Além disso, vacinas de DNA

têm a vantagem de induzir ambos os tipos de imunidade, celular e humoral (Babiuk, et al., 2000). O gene Cp1002_1802, que codifica para uma provável proteína secretada (CP1002_1802), sendo potencialmente antigênica, que pode vir a ser utilizada no desenvolvimento de vacinas recombinantes.

O objetivo deste trabalho foi a construção de uma vacina de subunidade recombinante, utilizando o gene Cp1802 de *C. pseudotuberculosis*, para que possa ser utilizada para o controle da Linfadenite Caseosa.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Para a construção do vetor de expressão em *Escherichia coli* (*E. coli*), o gene Cp1802 de *C. pseudotuberculosis* será amplificado por PCR utilizando os primers F 5' CGC GGA TCC ATCCCTATACCGACCCAGA e R5' GGC GAATTC TCACGTGACGTCCGCG. O gene foi digerido com as enzimas Bam HI e EcoRI, posteriormente ligado ao vetor pAE 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 por sequenciamento de DNA.

Um clone recombinante denominado de pAE/1802 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 pela técnica de Western Blot, utilizando 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 1038pb, correspondente ao gene cp1802 foi amplificado por PCR conforme mostrado na figura 1. Após a ligação deste ao vetor de expressão pAE, foi denominado de pAE/1802, o qual posteriormente foi caracterizado enzimaticamente através da digestão com as mesmas enzimas usadas na clonagem.



Figura 01: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR. (1) Marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). (2): PCR do gene cp1002_1802.

Foram utilizadas diferentes cepas de *E. coli* como Star, pLysS e RIL para verificar a expressão da proteína recombinante r1802. Essa verificação ocorreu através de SDS-PAGE e da técnica Western Blot, utilizando anticorpo monoclonal anti-his6xtag. A seguir, a proteína foi expressa e a identidade confirmada pela reação positiva com o anticorpo monoclonal anti-his6Xtag, sendo a cauda de histidina fusionada à proteína recombinante expressa.

Verificou-se ainda através do teste de solubilidade que a proteína é expressa na fração insolúvel, portanto 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 imunogênico.

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 de DNA também já foram utilizadas (Babiuk, et al., 2000). A proteína 1802 é uma proteína expressa no interior da *C. pseudotuberculosis* e secretada para o meio externo que, através de análises com soros de animais positivos para LC, foi descrita como potencialmente antigênica. Portanto esta proteína constitui-se num bom alvo para o desenvolvimento de uma vacina para o controle da LC.

4 CONCLUSÃO

O gene 1802 de *C. pseudotuberculosis* foi amplificado com sucesso. A proteína foi expressa com êxito em cepas de expressão de *E. coli*. Estes resultados sugerem que possivelmente a vacina contra LC venha a ser efetiva assim que a proteína recombinante 1802r utilizada para a imunização de camundongos, a fim de avaliar o potencial imunogênico da mesma, comprove sua imunogenicidade. Porém mais experimentos se tornam necessários para que se alcance um nível de proteção satisfatório para o controle da Linfadenite Caseosa.

5 REFERÊNCIAS

BABIUK, L.A., BABIUK, S.L., LOEHR, B.I., VAN DRUNNEN, Littel-van den Hur. Nucleic acid vaccines: research tool or commercial reality. **Vet Immunol Immunopathol**, Universidade de Saskatchewan, Canadá., v.76. p.1-23, 2000.

BROWN, C.C., OLANDER, H.J., ALVES, F.C. Synergistic hemolysis-inhibition titers associated with caseous lymphadenitis in a slaughterhouse survey of goats and sheep in northeastern Brazil. **Can. J.Vet. Res.** Canadá.,v.51. p.46–49, 1987.

CONCEIÇÃO, F.R., MOREIRA, A.N., DELLAGOSTIN, O.A. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. **Vaccine**, Centro de biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Brazil., v.24. 2006.

CORREA, W.N., CORREA, C.N.N. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. Editora Guanabara Koogan, 1992.

DE ROSE, R., ENNENT, J., MC WATERS, P., CHAPLIN, P.J., et al. Efficacy of DNA vaccination by different routes of immunisation in sheep. **Vet. Immunol. Immunopathol**, The Cooperative Research Centre for Vaccine Technology, CSIRO Livestock Industries, Australia., v.90. p.55-63, 2002.

DORELLA, F.A., PACHECO, L.G.C., SEYFFERT, N., PORTELA, R.W., MEYER, R., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. **Expert Review of Vaccines**, Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil., p.205-213, 2009.

MICHELON, A., MICHELON, M., SIMIONATTO, S., LAGRANHA, V.L., CONCEIÇÃO, F., VAZ, E.k., CERQUEIRA, G., DELLAGOSTIN, O.A. Effect of the Kozak sequence on seroconversion of mice immunized with a DNA vaccine against swine colibacilosi. **Brazilian Journal of Microbiology**, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Brazil., v.34, p.85-87, 2003.

PASCUAL, C., LAWSON, P.A., FARROW, J.A., GIMENEZ, M.N., COLLINS, M.D. Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16SrRNA gene sequences. **Int. J. Syst. Bacteriol**, Institute of Food Research, Reading Laboratory, United Kingdom., v.45, p.724-728, 1995.

PAULE, B.J.A., AZEVEDO, V., REGIS, L.F., CARMINATI, R., BAHIA, R.C., VALE, V.L.C., MOURA-COSTA, L.F., FREIRE, S.M., NASCIMENTO, I., SCHAEER, R., GOES, A.M., MEYER, R. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon production, IgG avidity and antigen recognition by Western Blotting. **Vet. Immunol. Immunopathol**, Laboratório de Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Brasil., v.96, p.129-139, 2003.

SEIXAS, F.K., DA SILVA, E.F., HARTWIG, D.D., CERQUEIRA, G.M., AMARAL, M., FAGUNDES, M.Q., DOSSA, R.G., DELLAGOSTIN, O.A. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. **Vaccine**, Universidade Federal de Pelotas, Centro de Biotecnologia, Brasil., v.26 p.88-95, 2007.