

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

RODRIGUES C., Suelen¹; BRUM, Alexandre¹; BRAITE, Drielly¹; AZEVEDO, Vasco²; BORSUK, Sibebe¹

¹ Laboratório de Pesquisa em Doença Infecciosas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico-Biotecnologia; ² Departamento de Biologia Geral, UFMG.
suelencrodrigues@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

A Linfadenite Caseosa (LC) é causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que é uma bactéria gram positiva não esporulada, sendo esse microorganismo resistente a dessecação por um longo período e permanecendo vivo na carne congelada, nas fezes, pele, solo, intestino e também em vísceras contaminadas (ANDERSON, 2005). É uma doença infecto-contagiosa que acomete caprinos e ovinos, ocasionando grandes perdas econômicas devido à sua alta incidência, especialmente em regiões tropicais e subtropicais (SOBRINHO *et al.*, 2001); essa doença causa a condenação da carcaça dos animais, a perda da pele ocasionada pelos inúmeros abscessos e também pode gerar a morte do animal acometido (DORELLA, MEYER *et al.*, 2002). É endêmica no Brasil e possui uma prevalência próxima de 30% (VESCHI, 2005). Trata-se de uma doença de fácil contágio, basta apenas a presença de animais infectados em um rebanho sadio, para que aja a contaminação (SOBRINHO, 2001). O tratamento com antibióticos não é recomendado devido ao seu alto custo, pois o pode durar até meses; esses medicamentos também não possuem a capacidade de atravessar a capsula desses abscessos, tornando-se praticamente impossível erradicar a doença (ALVES, 1997).

As vacinas mortas não apresentam resultados satisfatórios no controle para esta doença, uma vez que o agente bacteriano age dentro da célula. Além disso, as vacinas existentes apresentam imunidade humoral e celular separadamente, o que diminui sua eficácia.

As vacinas de subunidades recombinantes são uma alternativa para uma imunoproteção mais eficaz, já que oferecem tanto imunidade humoral quanto celular, o que acarreta em uma maior proteção são de baixo custo de produção, não oferecem riscos e podem ser produzidas em maior escala. Uma vacina de DNA contra LC já foi testada, porém com resultado pouco satisfatório (COSTA *et al.*, 2011). Com o sequenciamento do genoma de *C. pseudotuberculosis*, possibilitou a identificação de novos alvos para uso em vacinas recombinantes (SILVA, *et al.*, 2011). Assim, o objetivo deste trabalho foi a construção de vacinas de subunidade recombinantes para o controle da LC utilizando os genes *Cp1002_0369*, *Cp1002_1802* e *Cp1002_1957* de *C. pseudotuberculosis*.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Para a construção do vetor de expressão em *Escherichia coli* os genes *Cp1002_0369*, *Cp1002_1802* e *Cp1002_1957* de *C. pseudotuberculosis* foram amplificados por PCR utilizando os primers F5' CGGGGATCC CAGCCAGTGCTTCAGGTC e R5' CCCAAG CTTTTATTTTTGTACCGCTTGCTC, F5' CGC GGA TCC ATCCCTATACCGACCCAGA e R5' GGC GAATTC

TCACGTGACGTCCGCG e F5': CGC GGA TCC GGCCTCGCGACTGG 3' R5' CCG GAATTC TTACCAGGCGTTCATAACGT 3' respectivamente. Os genes foram digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III (1802 e 1957) e *Bam*HI e *Eco*RI (0369), posteriormente, ligados ao vetor pAE e digerido com as mesmas enzimas com o auxílio da enzima T4 DNA ligase. O produto das ligações foram transformados por eletroporação em células de *E. coli* Top10. Os clones recombinantes foram caracterizados enzimaticamente e foi realizado sequenciamento de DNA.

Os clones recombinantes (pAE/Cp1002_0369, pAE/Cp1002_1802 e pAE/Cp1002_1957) foram utilizados para a transformação da cepa de expressão *E. coli* BL21 Star. A detecção da expressão das proteínas, bem como sua pureza, foram observadas através de SDS-PAGE e por Western Blot utilizando o anticorpo monoclonal anti-6Xhistag (Sigma). A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de sepharose (HisTrap™), carregada com níquel.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um fragmento de 900 pb, de 1038 pb e 933 pb correspondentes aos genes *Cp1002_0369*, *Cp1002_1802* e *Cp1002_1957* foram amplificados por PCR (Fig. 01) e ligados ao vetor de expressão pAE. A caracterização dos clones recombinantes foi realizada por enzimaticamente e por seqüenciamento de DNA.

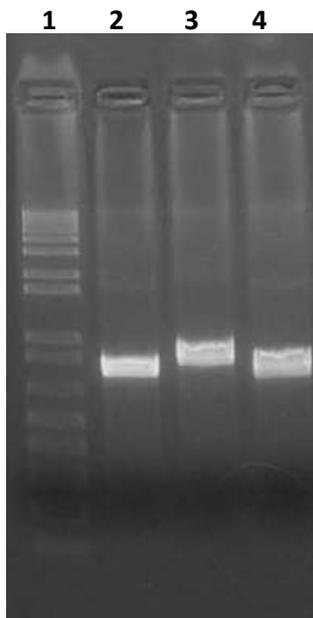


Figura 01: Eletroforese em gel de agarose 1%. (1) Marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). (2): Gene *Cp1002_0369*. (3) Gene *Cp1002_1802*. (4) Gene *Cp1002_1957*.

A Expressão das proteínas recombinantes (r0369, r1802 e r1957) foi verificada, através de SDS-PAGE e de *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-his6xtag. Verificou-se por meio do teste de solubilidade que a proteína é expressa na fração insolúvel, portanto, esta foi purificada utilizando agentes desnaturantes nos tampões de purificação. As três proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade ao níquel como pode ser observado na figura 2. Estas serão utilizadas 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 usadas 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, Costa *et al.* 2011). As proteínas 0369, 1802 e 1957 são proteínas de secretoma de *C. pseudotuberculosis* e, portanto, com potencial antigênico através de análises com soros de animais positivos para LC, portanto, são bons alvos para o desenvolvimento de uma vacina para esta doença.

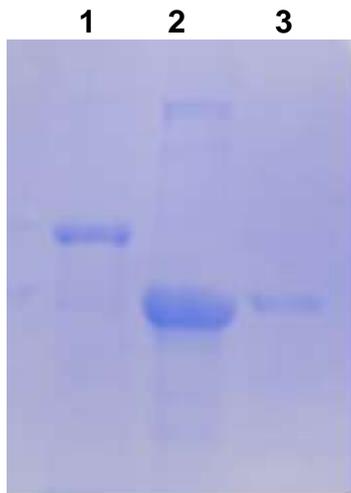


Figura 02: Eletroforese SDS-PAGE 12% das proteínas purificadas.(1): proteína 0369. (2): proteína 1802. (3): proteína 1957.

4 CONCLUSÃO

As proteínas 0369r, 1802r e 1957r foram expressas e purificadas com êxito, estas, posteriormente serão utilizadas 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

ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. Linfadenite caseosa – Recomendações e medidas profiláticas. **Embrapa** – Comunicado Técnico, n. 33, p. 1-4, 1997.

ANDERSON, D. E.; RINGS, D. M.; PUGH, D. G. Enfermidades do Sistema tegumentar. In: PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, p. 232-233. 2005.

MEYER, R.; CARMINATI, R.; CERQUEIRA, R. B.; VALE, V.; VIEGAS, S.; MARTINEZ, T.; NASCIMENTO, I.; SCAER, R.; SILVA, J. A. H.; RIBEIRO, M.; RÉGIS, M.; PAULE, B.; FREIRE, S. M. Avaliação da resposta imune humoral em caprinos inoculados com uma vacina viva atenuada liofilizada contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*, **R. Ci. Méd. Biol.**, v. 1, n. 1, p. 42-48, 2002.

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

VESCHI, J. L. Linfadenite caseosa. In: **VII ENCONTRO DE CAPRINOCULTORES**

DO SUL DE MINAS E MÉDIA MOGIANA, Espírito Santo do Pinhal. Anais. 2005.

COSTA MP, MCCULLOCH JA, ALMEIDA SS, DORELLA FA, FONSECA CT, OLIVEIRA DM, TEIXEIRA MF, LASKOWSKA E, LIPINSKA B, MEYER R, PORTELA RW, OLIVEIRA SC, MIYOSHI A, AZEVEDO V. Molecular characterization of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* hsp60-hsp10 operon, and evaluation of the immune response and protective efficacy induced by hsp60 DNA vaccination in mice. **BMC Res Notes**. V.20;nº4, p.243, 2011.

SILVA A, SCHNEIDER MP, CERDEIRA L, BARBOSA MS, RAMOS RT, CARNEIRO AR, SANTOS R, LIMA M, D'AFONSECA V, ALMEIDA SS, SANTOS AR, SOARES SC, PINTO AC, ALI A, DORELLA FA, ROCHA F, DE ABREU VA, TROST E, TAUCH A, SHPIGEL N, MIYOSHI A, AZEVEDO V. Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* I19, a strain isolated from a cow in Israel with bovine mastitis. **J Bacteriol**. nº193(1), p.323-4, 2011.