

DESENVOLVIMENTO DA VACINA DE DNA UTILIZANDO O GENE 0369 DO *Corynebacterium pseudotuberculosis* PARA O CONTROLE DA LINFADENITE CASEOSA

**REZENDE, ANDREA¹; BRAITE, DRIELLY C.¹; BRUM, ALEXANDRE A.¹;
AZEVEDO, VASCO² E BORSUK, SIBELE¹**

¹Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia - UFPel

²Departamento de Biologia Geral, UFMG

andreabiomedica@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A Linfadenite Caseosa (LC) é uma doença crônica, infectocontagiosa, que acomete pequenos ruminantes, acarretando sérias perdas econômicas para as atividades de ovinocaprinocultura. É reconhecida como doença de importância mundial, em decorrência da alta prevalência e pelos prejuízos econômicos nos rebanhos (D'AFONSECA *et al.*, 2008). É causada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis*, uma bactéria gram-positiva, intracelular facultativa (MORAES *et al.*, 2010) A medida de melhor custo-benefício contra a disseminação da LC é a imunização. Entretanto, não existe uma vacina suficientemente protetora contra a *C. pseudotuberculosis*. Vários estudos mostram diferentes estratégias que vêm sendo testadas, como o uso de bactérias atenuadas ou inativadas, frações contendo antígenos da parede da bactéria ou do sobrenadante de cultura bacteriana e ainda uma mistura de componentes celulares e sobrenadante (DORELLA *et al.*, 2009). Todas as preparações ofereceram certo grau de proteção contra infecções experimentais e até mesmo naturais. Contudo, os níveis de proteção e a severidade das lesões são variáveis.

A identificação de determinantes moleculares presentes no genoma da bactéria *C. pseudotuberculosis* (D'AFONSECA, *et al.*, 2008) permite o uso da vacinologia reversa na formulação de novas estratégias vacinais, as quais podem possibilitar um controle mais efetivo da LC nos rebanhos. Alguns antígenos já foram avaliados nesta abordagem (BURREL, 1983; HODGSON *et al.*, 1990; HODGSON *et al.*, 1999; DE ROSE, 2002, FONTAINE, 2006), no entanto apresentaram proteção pouco satisfatória. Uma vacina de DNA contra LC já foi testada, porém com resultado pouco satisfatório (COSTA *et al.*, 2011).

Com a finalidade de obter uma vacina protetora e mais segura, diferentes estratégias vêm sendo testadas, como vacinas recombinantes e vacinas de DNA em caprinos e ovinos. Ambas apresentam potencial protetor sem riscos de causar a doença. Além disso, as vacinas de DNA têm a vantagem de induzir ambos os tipos de imunidade, celular e humoral (BABIUK, *et al.*, 2000). Várias linhagens de *C. pseudotuberculosis* foram sequenciadas o que possibilitou a identificação de novos alvos para o uso de vacinas recombinantes (SILVA *et al.*, 2011). Com o resultado do sequenciamento e da análise proteômica complementar, foram identificados vários alvos, dentre eles pode-se citar o gene *Cp1002_0369*, que codifica para uma provável proteína secretada sendo esta provavelmente uma fosfoesterase, potencialmente antigênicas, as quais podem vir a ser utilizadas no desenvolvimento de vacinas recombinantes.

Em vista disso, o nosso objetivo foi construir uma vacina de DNA utilizando o gene *Cp1002-0369* do *C. pseudotuberculosis* para ser utilizada no controle da LC.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PCR

A amplificação do gene *cp1002_0369* foi realizada utilizando primers F5'CGG GGA TCC CAG CCA GTG CTT CAG GTC 3' e R5'CCC AAG CTT TTA TTT TTG TAC CGC TTG CTC 3'. Para a PCR foram utilizados 50 ng de DNA cromossomal, além de 10µM de cada primer e Mastermix (Promega) num volume final de 50 µL. O Produto da PCR foi visualizado em gel de agarose corado com Corante Syber Green/Blue Green.

2.2. Ligação ao vetor pTARGET

O fragmento de 900 pb referente ao gene *Cp1002_0369* foi ligado ao vetor de expressão em eucarioto pTARGET(Promega).A ligação foi feita utilizando produto de PCR à 1 µL do vetor pTARGET, a reação foi mantida a 4°C por 16 h. Posteriormente 1 µL do produto da ligação foi utilizado para a transformação por eletroporação em *Escherichia coli* TOP10. Os clones recombinantes foram selecionados com X-gal e IPTG. As colônias brancas foram selecionadas para cultivo em LB líquido e a extração do DNA plasmidial foi feita com auxílio do kit Miniprep (Promega) e posteriormente caracterizadas enzimaticamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um fragmento de 900 pb referente ao gene *Cp1002_0369* foi obtido por PCR (Figura 1). A caracterização dos clones recombinantes foi feita por digestão com a enzima *EcoRI*, como pode ser observado na Figura 2, um fragmento referente ao tamanho do gene foi liberado.

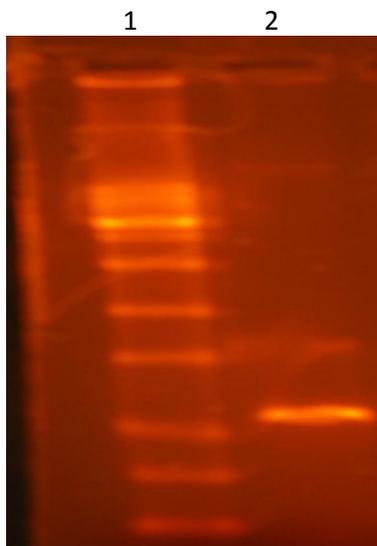


Figura 01: Eletroforese em gel de agarose 1%. (1) Marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). (2) Gene *Cp1002_0369*.

Na figura 2 é possível identificar cinco clones de pTARGET/*Cp1002_0369* selecionados, e a liberação do gene após a digestão com *EcoRI*. Demonstrando que os clones recombinantes em questão são viáveis para a produção da vacina de DNA, visto que essa viabilidade se

efetivará após transfecção em células VERO que será realizada posteriormente.

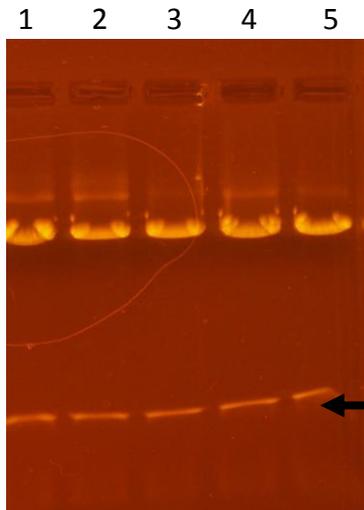


Figura 02: Eletroforese em gel de agarose 1% das cinco amostras do produto da ligação do gene pTARGET/ Cp1002_0369 demonstrando a liberação dos fragmentos (seta). De 1 a 5- diferentes clones de pTARGET/ Cp1002_0369.

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, COSTA *et al.* 2011), porém mesmo induzindo uma resposta imune não conferiram proteção contra a infecção do *C. pseudotuberculosis* (COSTA *et al.*, 2011). O gene Cp1002_0369 é encontrado em alta densidade no secretoma de *C. pseudotuberculosis*, espera-se que uma vacina de DNA contendo esse gene possa ser mais efetiva para o controle da LC em relação as vacinas já testadas.

4. CONCLUSÕES

A vacina de DNA (pTAGET/0369) foi desenvolvida com êxito. Posteriormente será realizada a transfecção em células VERO para verificar a expressão da proteína em células eucariotas para posteriormente ser utilizada para imunização de camundongos, com a finalidade de avaliar o potencial imunogênico desta vacina para o controle da Linfadenite Caseosa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Babiuk, L.A.; Babiuk, S.L.; Loehr, B.I.; Den Hur, V.D.L. Nucleic acid vaccines: Research tool or commercial reality. *Vet Immunol Immunopathol*, 2000; 76:1-23.

Binns, S.H.; Bailey, M.; Green, L.E. Postal survey of ovine caseous lymphadenitis in the United Kingdom between 1990 and 1999. *Vet Rec.* 2002; 150: 263-8.

Burrell, D.H. Caseous lymphadenitis vaccine. *N. S. W. Veterinary* 1983; 19:53-57.

Costa, M.P.; Mcculloch, J.A.; Almeida, S.S.; Dorella, F.A.; Fonseca, C.T.; Oliveira, D.M.; Texeira, M.F.; Laskowska, E.; Lipinska, B.; Meyer, R.; Portela, R.W.; Oliveira, S.C.; 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 2011; 20: p.243.

D'Afonseca, V.; Moraes, P.M.; Dorella, F.A.; Pacheco, L.G.C.; Meyer, R.; Portela, R.W.; Miyoshi, A.; Azevedo, V. A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. Genetics and Molecular Research 2008; 7:252-260.

De Rose, R.; Ennent, J.; McWaters, P.; Chaplin, P.J. *et al.* Efficacy of DNA vaccination by different routes of immunisation in sheep. Vet. Immunol. Immunopathol 2002; 90:55-63.

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 2009; 8:205-213.

Fontaine, M. C.; Baird, G.; Connor, K. M.; Rudge, K.; Sales, J.; Donachie, W. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Vaccine 2006; 24: 5986–5996.

Hodgson, A.L.; Bird, P.; Nisbet, I.T. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. J. Bacteriol. 1990; 172:1256-1261.

Hodgson, A.L.; Carter, K.; Tachedjian, M.; Krywult, J. *et al.* Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. Vaccine 1999; 17: 802-808.

Moraes, P.M.R.; D'Afonseca, V.; Costa, M.P.; Hirata J.; Rocha, F.S.; Oliveira, C.A.A.; Miyoshi, A.; Azevedo, V. Estudo do papel do operon opp na virulência e patogenicidade de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In: Congresso Brasileiro de Genética 2010. Guarujá-SP. Resumos/Guarujá - ISBN 978-85-89109-06-2. Pugh, G.D. Sheep and goat medicine. New York: Elsevier; 2004.

Radostits, O.M.; Blood, D.C.; Gay, C.C. Veterinary medicine: A textbook of the diseases of catlee, sheep, pigs, goats and horses. 9th ed. Philadelphia: Bailliere Tindall 200; p. 830-9.

Silva, A.; Schneider, M.P.; Cerdeira, L.; Barbosa, M.S.; Ramos, R.T.; Carneiro, A.R.; Santos, R.; Lima, M.; D'Afonseca, V.; Almeida, S.S.; Santos, A.R.; Soares, S.C.; Pinto, A.C.; Ali, A.. Dorella, F.A.; Rocha, F.; De Abreu, V.A; 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 2011; n°193(1), p.323-4.