



AVALIAÇÃO DE VACINAS RECOMBINANTES PARA O CONTROLE DE *Neospora caninum*

RODRIGUES, Suelen Costa¹, LUCAS, Caroline, BORSUK, Sibeles¹, HARTBLEIN, Claudia¹, LEIVAS LEITE, Fábio Pereira¹, PINTO, Luciano da Silva¹ e AIRES BERNE, Maria Elisabeth¹

¹Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UFPel, Pelotas, RS, Campus Capão do Leão, Caixa Postal 354 – Pelotas – RS, CEP 96010-900 suelencrodrigues@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A neosporose, causada por *Neospora caninum*, é uma doença que causa patologias severas em cães e em bovinos em todo o mundo, ocasionando grandes perdas econômicas. Esse parasito foi descrito pela primeira vez em 1988, pois até o momento era confundido com o *Toxoplasma gondii* (Dubey *et al.*, 1988). Os cães são os hospedeiros definitivos, eles eliminam os oocistos não esporulados pelas fezes e assim transmitem a doença a várias espécies (bovinos, caninos, caprinos, ovinos, eqüinos e cervídeos) que servem como hospedeiros intermediários. Esses oocistos só serão infectantes após a esporulação (em média após três dias), os hospedeiros intermediários os ingerem e uma vez que penetrem nas células passam a se chamar taquizoítos que iram se dividir rapidamente e invadir varias células causando severas lesões em diversos órgãos (McAllister *et al.*, 1998). A transmissão vertical (transplacentária) é a principal forma de disseminação de *N. caninum* em rebanhos bovinos leiteiros (causando aborto), mantendo a infecção por várias gerações (Dubey *et al.*, 1988; Thurmond & Hietala, 1997).

As vacinas comerciais preparadas com taquizoitos inativados possuem uma baixa eficiência de proteção. Além disso, a obtenção dos taquizoitos a partir de cultivos celulares é trabalhosa e tem custo elevado. Além disso, apesar das vacinas comerciais desenvolvidas com taquizoítos inativos, aumentarem a resposta imune celular e produção de IFN γ , elas não conseguem impedir a transmissão transplacentária do parasito.

Vacinas recombinantes são uma alternativa para uma imunoproteção mais eficaz e com menor custo de produção. Algumas proteínas imunodominantes, presentes em grande quantidade na superfície dos taquizoitos tem sido descritas como um antígeno potencial para uso no desenvolvimento de uma vacina recombinante. A proteína imunodominante NcSRS2, presente na superfície dos bradizoitos e taquizoitos de *N. caninum* já apresentou potencial protetor (Hemphill *et al.*, 1997). O objetivo deste

trabalho foi avaliar a imunogenicidade da proteína NcSRS2 recombinante administrada com diferentes adjuvantes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O gene *ncsrs2* de *N. caninum* foi clonado no vetor pET200 (Invitrogen) e a proteína correspondente a este gene foi expressa em *E. coli* BL21DE3 Codon Plus RIL. A proteína NcSRS2 recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose (HisTrap™) carregada com níquel, usando o sistema automatizado de purificação ÄKTA-Prime (GE Healthcare). A pureza da mesma foi verificada em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%), a concentração determinada pelo kit BCA™ Protein Assay (Pierce). A identidade da proteína purificada foi confirmada em *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-histidina.

A proteína recombinante NcSRS2 purificada (NcSRS2r) foi utilizada na inoculação de camundongos. Um total de 10 camundongos BalbC foram utilizados por grupo (grupo A. NcSRS2r; Grupo B. NcSRS2r + Óleo; Grupo C. NcSRS2r + Xantana; Grupo D. NcSRS2r + Hidróxido de Alumínio; Grupo E. NcSRS2r + Lectina BVL e Grupo F. Solução salina). A NcSRS2r foi administrada em duas doses contendo 20 µg, com intervalo de 21 dias por via intraperitoneal, exceto no grupo B, que foi intramuscular.

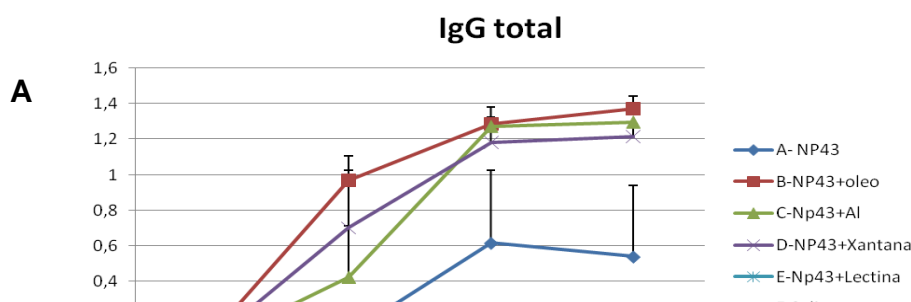
A avaliação do título de anticorpos gerados das diferentes formulações de vacina foi avaliada por ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assays*) indireto utilizando a NcSRS2r (0,5 µg/mL) para a sensibilização de placas de poliestireno. Os soros dos camundongos (1:50) e o anti-soro IgG total, IgG1 e IgG2a de camundongo conjugado com peroxidase (1:5000) foram diluídos em tampão PBS/leite em pó 5%. A reação foi desenvolvida com OPD (*o*-phenylenediamine dihydrochloride) e a densidade ótica (OD) medida a 492 nm em leitor de ELISA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A neosporose, causada por *Neospora caninum*, é uma doença que causa grandes perdas econômicas (Dubey *et al.*, 2003). A proteína de superfície NcSRS2 é comum em ambos os estágios taquizoitos e bradizoitos de *N. caninum* e por isso constitui um bom alvo para utilização como vacina (Hemphill *et al.*, 1997; Hemphill & Gottstein, 1996). Neste trabalho esta proteína foi avaliada como uma vacina recombinante de subunidade administrada com 4 diferentes adjuvantes. A capacidade destas formulações de vacina em induzir uma resposta imune humoral foi avaliada por ELISA. O título de anticorpos sistêmicos foi monitorado por ELISA indireto utilizando como antígeno a NcSRS2r.

Três formulações de vacina (NcSRS2 + óleo, NcSRS2 + Xantana, NcSRS2 + Hidróxido de alumínio) foram capazes de induzir uma resposta imune humoral específica em camundongos (figura 1A). Quando foi realizada a isotipagem a mesma cinética entre os diferentes grupos foi observada (figura 1 B e C). A vacina NcSRS2+ Lectina BVL modulou a resposta imune de forma negativa, não havendo a produção de anticorpos específicos. O título de IgG1 foi maior em todas as formulações testadas.

A resposta celular induzida por estas vacinas esta sendo avaliada por meio de RT-PCR de citocinas específicas.



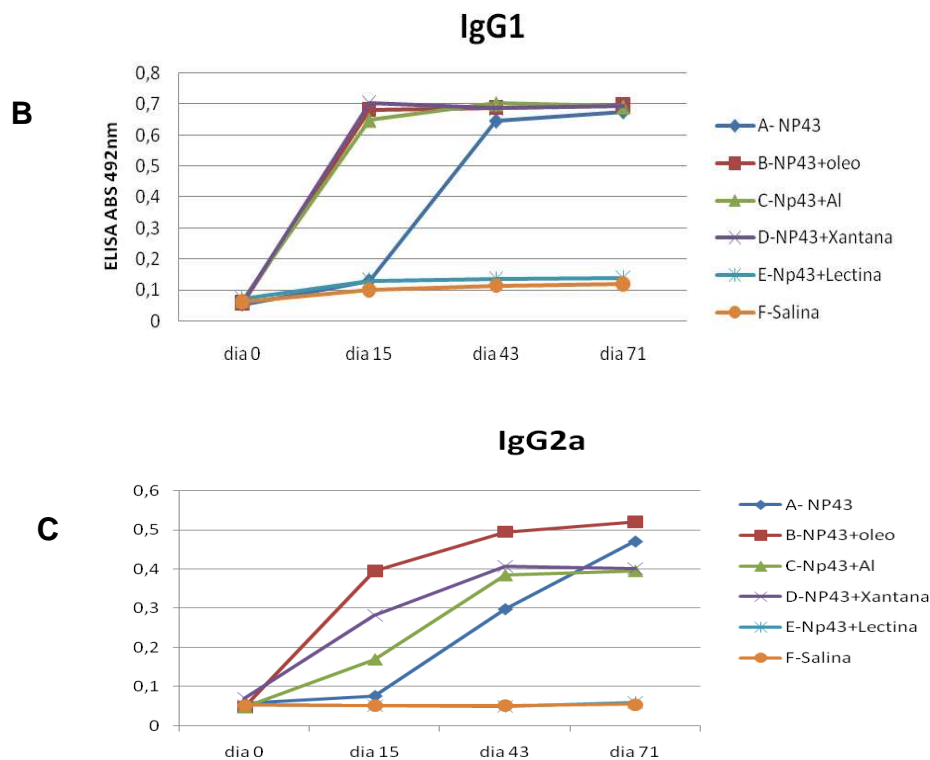


Figura 1: Resposta imune humoral induzida pelas vacinas recombinantes avaliada através de ELISA indireto nos dias 0, 15, 43 e 71 após a vacinação. **A.** Títulos de IgG total, **B.** Títulos de IgG1, **C.** Título de IgG2a.

4. CONCLUSÕES

As vacinas recombinantes desenvolvidas são capazes de induzir uma resposta imune humoral específica com títulos de IgG1 e IgG2a. A formulação de vacina, utilizando a lectina BVL como adjuvante não induziu anticorpos nos camundongos. As vacinas recombinantes testadas podem ser uma importante medida de controle da neosporose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS, & Topper MJ (1988). Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J Am Vet Med Assoc* **193**, 1259-1263.

Dubey JP, Ross AD, & Fritz D (2003). Clinical *Toxoplasma gondii*, *Hammondia heydorni*, and *Sarcocystis* spp. infections in dogs. *Parassitologia* **45**, 141-146.

Hemphill A, Felleisen R, Connolly B, Gottstein B, Hentrich B, & Muller N (1997). Characterization of a cDNA-clone encoding Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. *Parasitology* **115 (Pt 6)**, 581-590.

Hemphill A & Gottstein B (1996). Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitol Res* **82**, 497-504.

McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, & McGuire AM (1998). Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* **28**, 1473-1478.

Thurmond MC & Hietala SK (1997). Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *Am J Vet Res* **58**, 1381-1385.