

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Desenvolvimento de vacina recombinante de
proteína M de *Streptococcus equi* subsp. *equi***

Liana Flores Maciel

Pelotas, 2012

Liana Flores Maciel

**Desenvolvimento de vacina recombinante de proteína M de *Streptococcus equi*
subsp. *equi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de conhecimento: Biologia Molecular e Imunologia Aplicada).

Orientador: Dr. Fabricio Rochedo Conceição

Co-orientador: Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

Pelotas, 2012

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

M152d Maciel, Liana Flores

Desenvolvimento de vacina recombinante de proteína M de *Streptococcus equi* subsp. *equi* / Liana Flores Maciel. – 70f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico, 2012. – Orientador Fabricio Rochedo Conceição; co-orientador Fábio Pereira Leivas Leite.

1.Biotecnologia. 2.SeM. 3.LTB. 4.Garrotilho. 5.Adenite equina. I.Conceição, Fabricio Rochedo. II.Leite, Fábio Pereira Leivas. III.Título

CDD: 636.10896

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fabricio Rochedo Conceição, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. João Rodrigo Gil de los Santos, Universidade Federal de Pelotas

Dr. Marcelo Mendonça, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr^a. Sibeles Borsuk, Universidade Federal de Pelotas

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, e pelas oportunidades colocadas em meu caminho.

Aos meus pais, Lisarbe e Jari, por terem acreditado na minha capacidade e me incentivado sempre, me apoiando nos momentos difíceis, não deixando que eu desistisse de lutar.

Ao meu parceiro de todas as horas, Junior, pelo carinho, compreensão e incentivo para prosseguir.

Aos meus irmãos e sobrinhos pelo simples fato de fazerem parte da minha vida.

Ao meu orientador Fabricio Rochedo Conceição pela orientação durante todo o desenvolvimento deste projeto. Em momentos em que tudo parecia dar errado sempre teve uma palavra de incentivo para continuar, contribuindo desta forma para meu crescimento profissional.

Ao Dr. Fábio Pereira Leivas Leite, pelas muitas vezes que auxiliou no desenvolvimento deste trabalho e por permitir que ele se desenvolvesse em seu laboratório.

A minha querida amiga Luana Alves Dummer, que me acompanhou e ajudou desde o início desta jornada, principalmente nos momentos mais difíceis. Mesmo longe nunca deixou de me auxiliar e participar ativamente deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, em especial: Bilica, Michele, Paula Finger, Paula Telmo, Matheus Rosa, Itauá Araújo e Carolina Magalhães pessoas que tornaram muitos dos meus dias de trabalho mais alegres e me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a outros amigos e colegas, não menos importantes, mas que são muitos para serem citados. Vocês também colaboraram para esta conquista.

Muito Obrigada!

RESUMO

MACIEL, Liana Flores. **Desenvolvimento de vacina recombinante de proteína M de *Streptococcus equi* subsp. *equi***. 2012. 70f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A equinocultura no Brasil ganha espaço em setores ligados ao lazer, cultura e turismo, sendo responsável por milhões de empregos. A Adenite Equina causada pelo *Streptococcus equi* subsp. *equi* é uma doença do aparelho respiratório de elevado impacto econômico, gerando gastos com mão-de-obra e perda de desempenho dos animais. Para amenizar este problema, medidas profiláticas são importantes, como por exemplo, a vacinação. Porém, as vacinas disponíveis no mercado protegem apenas 50% dos animais. Vários estudos vêm sendo realizados para obtenção de uma vacina mais eficiente contra a Adenite, onde vários fatores de virulência do patógeno estão sendo avaliados como possíveis antígenos vacinais, com destaque para a proteína M de *S. equi* (SeM). Com base nisso este trabalho objetivou o desenvolvimento e avaliação de uma vacina recombinante para controle da Adenite Equina, utilizando como antígeno a rSeM e como adjuvantes a subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (rLTB) e ou hidróxido de alumínio (Al(OH)₃). Para este estudo foram utilizados 72 camundongos Balb/c fêmeas divididos em 8 grupos e 18 cavalos divididos em 6 grupos, inoculados por via IM ou IN. Os resultados mostraram que a rSeM foi inócua e imunogênica para ambas as espécies avaliadas, estimulando níveis significativos de imunoglobulinas (Igs) anti-rSeM sem a necessidade de uso de qualquer adjuvante imunológico. Os adjuvantes rLTB e Al(OH)₃ não foram capazes de incrementar significativamente os títulos de Igs anti-rSeM em camundongos, enquanto que em cavalos o tratamento rSeM + rLTB (IM) promoveu um aumento significativo no título sérico de IgG anti-rSeM. Interessantemente, a produção de IgA secretória anti-rSeM no trato respiratório superior de cavalos teve aumento significativo no tratamento com rSeM + Al(OH)₃ (IM). Estes resultados são promissores para a continuidade de estudos visando a utilização da rSeM como antígeno vacinal. Da mesma forma, o uso da rLTB como adjuvante em vacinas para cavalos parece ser promissor.

Palavras-chave: SeM. LTB. Adenite Equina.

ABSTRACT

MACIEL, Liana Flores. **Development of a recombinant vaccine composed by M protein of *Streptococcus equi* subsp. *equi***. 2012. 70f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The business related to equines in Brazil has an important participation in activities as leisure, culture and tourism, being responsible for millions of jobs. The equine distemper caused by *Streptococcus equi* subsp. *equi* is a disease of the respiratory tract with economical impact, generating losses with treatment and reduction in the animal performance. To solve this problem, prophylactic measures, such as the vaccination, are important. However, available commercial vaccines do not offer protection to more than 50% of the vaccinated animals. Several studies are being performed aiming the achievement of an efficient vaccine against the Adenitis, where several virulence factors are being evaluated as possible vaccine antigens, specially the M protein (SeM). Thus, the present work aimed the development and evaluation of a recombinant vaccine to the control of the equine distemper composed of the SeM antigen co-administrated with the recombinant Heat-labile enterotoxin B subunit of *Escherichia coli* (rLTB) and/or aluminium hydroxide (Al(OH)₃). A total of 72 female BALB/c mice, divided into eight groups and 18 horses, divided into six groups, were inoculated by intramuscular or intranasal routes. The results obtained in the experiments showed that the rSeM was innocuous and immunogenic in both evaluated species, stimulating the production of specific immunoglobulin anti-rSeM without the addition of immunological adjuvant. Both adjuvant rLTB and Al(OH)₃ were not capable to increase the titer of immunoglobulin anti-rSeM in mice, while in horses, the treatment rSeM + rLTB (IM) showed a significant increase in the level of seric immunoglobulin IgG anti-rSeM. Interestingly, the production of anti-rSeM secretory IgA in the upper respiratory tract has a significant increase in horses treated with rSeM + Al(OH)₃ (IM). This result is promising to further studies with rSeM as an antigen for vaccines, as well as is the administration of rLTB as an immunological adjuvant.

Keywords: SeM. LTB. Strangles. Equine Adenitis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Eletroforese em gel de agarose 0,8% demonstrando a amplificação do gene <i>SeM</i>	49
Figura 2 Eletroforese em gel de agarose 0,8% para seleção dos clones recombinantes.....	49
Figura 3 SDS-PAGE 12% para análise da expressão em pequena escala dos clones recombinantes.....	50
Figura 4 <i>Western blot</i> com MAb anti-6xhis para caracterização das proteínas recombinantes.....	50
Figura 5 SDS-PAGE 12% para análise da conservação da rSeM.....	51
Figura 6 Cinética dos níveis médios de imunoglobulinas totais séricas anti-rSeM de camundongos inoculados por via intramuscular com diferentes tratamentos contendo rSeM.....	52
Figura 7 Título médio de Igs totais séricas anti-rSeM de camundongos inoculados por via intramuscular com diferentes vacinas contendo rSeM	53
Figura 8 Cinética dos níveis médios de imunoglobulinas totais séricas anti-rSeM de camundongos inoculados por via intranasal com diferentes vacinas contendo rSeM.....	54
Figura 9 Título médio de Igs totais séricas anti-rSeM de camundongos inoculados por via intranasal com diferentes vacinas contendo rSeM.....	54
Figura 10 Título médio de IgG sérica anti-rSeM de cavalos inoculados com diferentes vacinas contendo rSeM.....	55
Figura 11 Níveis médios de IgA secretora anti-rSeM no trato respiratório superior de cavalos inoculados com diferentes vacinas contendo rSeM	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Tratamentos e doses para imunização de camundongos.....46

Tabela 2 Tratamentos e doses para imunização de cavalos.....47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Bovine serum albumin
MAb	Anticorpo monoclonal
CNA	Comissão Nacional do Cavalo
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
TOP 10	<i>Escherichia coli</i> TOP 10 (Invitrogen™)
ESALQ	Escola de Ensino Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
SeM	Gene da Proteína M de <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>equi</i>
IN	Intranasal
IM	Intramuscular
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria Bertani
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MCT	Ministério da Ciência e Tecnologia
SeM	Proteína M de <i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i>
rSeM	Proteína M recombinante de <i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SEBRAE	Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
<i>S. equi</i>	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>equi</i>
PMSF	Fenilmetilsulfonil Fluoreto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2 ARTIGO 1: Potencial biotecnológico dos fatores de virulência de <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>equi</i>	17
Introdução.....	20
Fatores de virulência de <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>equi</i>	22
Aplicação biotecnológica dos fatores de virulência de <i>S. equi</i>	28
Conclusão.....	30
Referências bibliográficas	31
3 ARTIGO 2: Avaliação da imunogenicidade de proteína M recombinante de <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>equi</i> co-administrada com a subunidade B recombinante da enterotoxina termolábil de <i>Escherichia coli</i>	39
Introdução.....	42
Material e Métodos	43
Resultados.....	48
Discussão	56
Referências bibliográficas	59
4. CONCLUSÕES	62
5. REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui o maior rebanho de equídeos na América Latina e o terceiro maior rebanho do mundo com oito milhões de cabeças (MAPA, 2011). A equinocultura no país vem ganhando espaço principalmente em setores ligados ao lazer, cultura e turismo, sendo responsável, em 2006, por 1,2 milhões de empregos (ESALQ, 2006). A partir da criação, em 2003, da Comissão Nacional do Cavalo (CNA) que buscou parcerias com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE) e Escola de Ensino Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), o complexo do agronegócio do cavalo vem ocupando uma importante posição no cenário nacional. Porém, pouco se conhece sobre sua real situação, uma vez que este setor engloba aproximadamente 30 segmentos, que estão distribuídos entre insumos, criação e destinação final, proporcionando riqueza econômica e geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (MAPA, 2011). Com base nisso, o desenvolvimento de técnicas precisas de diagnóstico e prevenção de doenças são de extrema valia, tanto para o mercado como para a saúde animal.

As doenças do aparelho respiratório ocupam o segundo lugar dentre as doenças limitantes das atividades dos equinos, gerando gastos com mão-de-obra e perda de desempenho desses animais (FREY JR, 2006). Dentre as afecções do trato respiratório superior de cavalos, a Adenite Equina, ou “garrotilho”, é uma das mais comumente atingem os animais. Esta é uma enfermidade onde há baixa letalidade, porém, alta morbidade, o que tem grande relevância no que diz respeito a locais com grandes concentrações de equinos (SWEENEY et al., 2005). Por não haver disponibilidade no mercado de vacinas eficientes, torna-se difícil a profilaxia, uma vez que estas protegem apenas 50% dos animais (HARRINGTON et al, 2002; MORAES, 2005; WALLER; JOLLEY, 2007). Condições climáticas de frio e umidade facilitam a disseminação e sobrevivência do agente, porém a doença pode ocorrer em todas as épocas no ano. Em estudo realizado por Ivens et al. (2011) no Reino Unido houve mais de 700 surtos durante o ano de 2008, onde alguns envolveram mais de 200 cavalos, gerando significativos gastos econômicos.

O *Streptococcus equi* subsp. *equi*, agente etiológico da Adenite Equina, pode permanecer viável nas descargas nasais purulentas por semanas ou meses, e os

estábulo permanecem contaminados se não forem cuidadosamente limpos e desinfetados com iodo povidona ou clorhexidina, (MORAES, 2009). Estresse, transporte, excesso de trabalho, viroses e parasitoses aumentam a suscetibilidade dos animais e podem desencadear a enfermidade em animais com infecção latente (SCHILD, 2001).

A enfermidade ocorre quando, após contaminação de forma direta ou indireta, o *S. equi* penetra pela boca ou narinas e se adere a receptores específicos das tonsilas e linfonodos regionais onde desenvolvem-se abscessos, causando uma rinfaringite (TIMONEY, 2004; HIRSH e ZEE, 2003). Os sinais clínicos da doença surgem geralmente após duas semanas da exposição ao agente, e são típicos de um processo infeccioso generalizado (depressão, inapetência, febre), bem como secreção nasal, inicialmente serosa, passando a mucopurulenta e a purulenta em alguns dias, tosse produtiva, dor à palpação da região mandibular e aumento de volume de linfonodos, principalmente submandibulares, assim adotam posição de pescoço estendido devido à dificuldade de respiração (SWEENEY, 1993; AINSWORTH & BILLER, 2000).

O diagnóstico pode ser confirmado por isolamento do agente a partir de secreção nasal purulenta ou do conteúdo proveniente de abscessos. Atualmente é utilizada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que é capaz de detectar o agente vivo ou morto através da amplificação do gene da proteína SeM, permitindo a detecção de até 90% dos portadores (HARRINGTON et al., 2002). A técnica de ELISA também pode ser utilizado no diagnóstico indireto da enfermidade, demonstrando a presença de anticorpos específicos. Recentemente, a proteína M de *S. equi*, produzida no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, foi utilizada como antígeno em reações de ELISA indireto com resultados promissores, diferenciando animais sadios, doentes e vacinados (MORAES et al., 2007).

O tratamento da Adenite Equina é estabelecido conforme o seu estágio. Os animais sem abscessos nos linfonodos são tratados com penicilina G ou trimetoprim, associado à sulfametoxazol, via intramuscular, por 5-10 dias (SILVA; VARGAS, 2006). Havendo abscessos, aplicam-se substâncias revulsivas que facilitam a maturação, tais como iodo, para posteriormente realizar a punção. Após punção curativa deve ser feita a irrigação do abscesso com solução de iodo a 2%. Animais em risco podem ser tratados preventivamente com penicilina, durante o

período de exposição ao microorganismo (MORAES et al. 2009). Complicações devem ser tratadas com terapia de suporte como fluidoterapia, medicações expectorantes e antimicrobianos em dosagens superiores às normalmente recomendadas (SWEENEY et al., 2005).

O *S. equi* sintetiza vários fatores de virulência, entre eles cápsula de ácido hialurônico, adesinas, endopeptidases, hialuronidase, estreptolisina O, estreptoquinase, receptores para Fc de IgG e proteína M (TYMONEY, 2004; MORAES, 2008). Para produzir vacinas mais eficientes e conseqüentemente reduzir gastos com o tratamento dos animais se faz necessário um completo entendimento sobre a patogênese desse microorganismo.

A proteína M (SeM) de 58 kDa, codificada pelo gene *SeM*, por ser uma proteína de membrana com capacidade antifagocítica e de aderência, tem papel importante na patogenia sendo uma candidata promissora a antígeno vacinal. É uma molécula ácido-resistente com aspecto de fímbria que se projeta a partir da parede celular (TYMONEY et al., 1997; TYMONEY, 2004; MORAES, 2008). Esta proteína apresenta capacidade de se ligar ativamente ao fibrinogênio através de resíduos localizados na sua extremidade N-terminal (MEEHAN et al., 2000). Com esta interação os sítios para ligação de C3b na superfície da bactéria ficam escondidos, com isso há significativa redução na taxa de fagocitose (BOSSCHWITZ & TIMONEY, 1994; WALLER et al., 2011). Além disso, a SeM é capaz de se ligar aos fragmentos Fc de IgG, principalmente às subclasses IgG4 e IgG7. Tal ligação ocorre com resíduos localizados na região central entre as repetições A e B da proteína rompendo desta forma a ativação do complemento mediada por anticorpos, comprometendo assim a resposta imune do hospedeiro (MEEHAN et al., 2002; LEWIS et al., 2008; WALLER et al., 2011). Devido a estes fatores ela vem sendo avaliada como antígeno vacinal promissor.

Devido ao fato da infecção pelo agente ter início na mucosa respiratória, uma adequada estimulação do sistema imune associado à mucosa é estratégica, porém, antígenos administrados localmente não são imunogênicos, levando a tolerância imunológica (MCGHEE, 1992). Uma alternativa é a utilização de adjuvantes da imunidade de mucosa que estimulam uma melhor apresentação do antígeno e, conseqüentemente uma resposta imune local mais efetiva. A subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) é um potente adjuvante da imunidade de mucosa que vem ganhando destaque na produção de vacinas

(FINGERUT et al., 2005; CONCEIÇÃO; MOREIRA; DELLAGOSTIN; 2006; FISCHER et al., 2010). Esta subunidade atóxica estimula uma resposta sistêmica e secretória (IgAs) de anticorpos contra antígenos co-administrados ou fusionados. A sua função adjuvante parece estar relacionada à sua capacidade de ligação ao gangliosídeo GM1, um glicolípido amplamente distribuído na superfície de células eucarióticas (DE HAAN et al., 1998).

Dentre as vacinas contra garrotilho, há as bacterinas que utilizam, geralmente, cepas autóctones de *S. equi*, subsp. *equi*, e hidróxido de alumínio como adjuvante e as vacinas de subunidade utilizam proteína M ou frações dela. Uma cepa mutante não encapsulada denominada de Pinnacle (Pinnacle I.N, Fort Dodge Animal Health, USA) utilizada como vacina intranasal não teve sua comercialização licenciada na Europa devido a preocupação com segurança, já a Equilis StrepE (Equilis StrepE, Intervet UK) chegou a ser comercializada mas foi retirada do mercado em 2007 pelas mesmas questões de segurança (NEWTON; WALLER; KING, 2005; KEMP-SYMONDS; KEMBLE; WALLER, 2007; GUSS et al., 2009). No Brasil estão disponíveis uma vacina que contém antígenos de *S. equi* subesp. *equi*, *S. pyogenes*, *Micrococcus pyogenes* e *Pasteurella multocida*, uma composta por uma suspensão de *S. equi* em soro fisiológico e inativada por calor, e outra constituída por cultivo total de *S. equi* inativado por formol (ANDREI, 2002). Portanto, o desenvolvimento de uma vacina mais eficaz e barata é importante para o controle da Adenite Equina.

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver e avaliar uma vacina recombinante para controle da Adenite Equina composta pelo antígeno rSeM co-administrado com rLTB.

HIPÓTESE:

Proteína M recombinante de *S. equi* co-administrada com a subunidade B recombinante da enterotoxina termolábil de *E. coli* induz resposta imune humoral em camundongos e cavalos.

OBJETIVO GERAL:

Desenvolver e avaliar uma vacina recombinante para controle da Adenite Equina composta pelo antígeno rSeM co-administrado com rLTB.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Expressar e purificar rSeM e rLTB;
- Elaborar vacinas com rLTB e rSeM;
- Avaliar a inocuidade e imunogenicidade da vacina em camundongos;
- Avaliar a inocuidade e imunogenicidade da vacina em cavalos.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

2. Trabalho 1

Artigo a ser submetido à Revista Ciência Rural

35 **Potencial biotecnológico dos fatores de virulência de *Streptococcus equi***
36 **subsp. *equi***

37
38 Liana Flores Maciel, Luana Alves Dummer, Fábio Pereira Leivas Leite, Fabricio Rochedo
39 Conceição*

40
41 **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

42 **Resumo**

43 A Adenite Equina, conhecida como garrotilho, é uma doença contagiosa que afeta o trato
44 respiratório superior dos equinos e é causada pela bactéria β -hemolítica *Streptococcus equi*
45 subsp. *equi*. Há vários fatores de virulência descritos para o agente *S. equi* que auxiliam na
46 patogenia da doença. A cápsula de ácido hialurônico confere aspecto mucoso às colônias e
47 maior virulência aos isolados que a produzem fornecendo alta capacidade antifagocítica.
48 Enzimas como hialuronidase, estreptolisina e estreptoquinase estão relacionadas a
49 característica de β -hemólise, penetração das mucosas e difusão tecidual, crescimento
50 bacteriano, lise osmótica irreversível das células entre outras. A proteína M (SeM),
51 importante por ser uma proteína de membrana com capacidade antifagocítica e de aderência,
52 possui aspecto de fímbria projetando-se a partir da parede celular. A SeM está associada ao
53 aumento da virulência em comparação ao ancestral da subespécie *zooepidemicus*. Outros
54 fatores como presença de receptores para Fc de IgG, endopeptidases, exotoxinas pirogênicas,
55 além de outras proteínas extracelulares que auxiliam na aderência às células-alvo (adesinas)
56 são importantes para a patogenia do agente. Nesta revisão, o potencial biotecnológico dos
57 fatores de virulência de *S. equi* subsp. *equi* foi discutido.

58 **Palavras-chave:** Adenite Equina, Garrotilho, *Streptococcus equi*, fatores de virulência.

59 _____
60 Centro de Desenvolvimento Tecnológico - Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, CP 354, 96010900 Pelotas/RS

61 *Autor para correspondência: fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

88 1- Introdução

89 O Brasil possui o terceiro maior rebanho de equinos do mundo e assim o complexo do
90 agronegócio do cavalo vem ganhando importante posição no cenário nacional, principalmente
91 nos setores ligados ao lazer, cultura e turismo, sendo responsável pela geração de 3,2 milhões
92 de empregos diretos e indiretos (MAPA, 2011).

93 A capacidade de produzir animais de alta qualidade eleva a perspectiva de
94 crescimento do setor. Contrapondo esta realidade de crescimento, a ocorrência de doenças
95 infecciosas gera perdas econômicas significativas aos criadores quando, por exemplo, torna-se
96 necessário a interrupção do treinamento desses animais.

97 A Adenite Equina, também conhecida como garrotilho, é uma doença contagiosa que
98 afeta o trato respiratório superior dos equinos e é causada por *Streptococcus equi* subsp. *equi*,
99 bactéria Gram-positiva, β -hemolítica e pertencente ao grupo C de Lancefield (TIMONEY,
100 2004). O termo garrotilho foi estabelecido porque cavalos afetados e não tratados
101 frequentemente pareciam estar sendo estrangulados (garroteados), pois os linfonodos
102 tornavam-se aumentados obstruindo a faringe (SWEENEY, 1993). Esta foi uma das primeiras
103 moléstias equinas descritas, sendo que em 1664, Solleysell descreveu o garrotilho como uma
104 infecção pela qual os cavalos jovens tinham que passar. Convencido da natureza contagiosa
105 da doença, este autor recomendou o isolamento dos animais afetados, enfatizando que a fonte
106 mais comum de infecção consistia de baldes de água compartilhados pelos animais doentes e
107 sadios. Assim, a transmissão da enfermidade pode ocorrer de forma direta tanto por cavalos
108 que estão incubando a doença ou apresentam sinais clínicos quanto por animais que estão se
109 recuperando ou são portadores. A forma indireta da transmissão se dá por meio de fômites,
110 tais como buçais e outros utensílios, e de pastagens, aguadas e estábulos contaminados com
111 secreções (MORAES, 2008). Equídeos de todas as idades podem padecer a doença, embora

112 seja mais frequente em animais com menos de cinco anos de idade, especialmente, potros
113 (AINSWORTH & BILLER, 2000).

114 Os animais mostram sinais clínicos típicos de um processo infeccioso generalizado
115 (depressão, inapetência, febre), assim como secreção nasal, inicialmente serosa, que passa a
116 mucopurulenta e a purulenta em alguns dias, tosse produtiva, dor à palpação da região
117 mandibular e aumento de volume de linfonodos, principalmente submandibulares
118 (SWEENEY, 1993; AINSWORTH & BILLER, 2000).

119 Além do *S. equi* subsp. *equi*, também pertecem ao grupo C de Lancefield *S. equi*
120 subsp. *zooepidemicus* e o *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. Estes microrganismos são
121 relacionados geneticamente, porém com potencial patogênico diferenciado e frequentemente
122 isolados de amostras clínicas como contaminantes secundários (TIMONEY, 2004).

123 *S. equi* subsp. *equi* é fenotipicamente relacionado com *S. equi* subsp. *zooepidemicus*.
124 Ambos eram considerados até 1984 espécies distintas (FACKLAM, 2002). A fermentação de
125 lactose, sorbitol e trealose é utilizada como critério para a diferenciação dessas espécies, pois
126 *S. equi* subsp. *equi* não fermenta nenhum destes carboidratos enquanto que *S. equi* subsp.
127 *zooepidemicus* fermenta lactose e sorbitol (KUWAMOTO et al., 2001). No entanto, cepas
128 atípicas de *S. equi* subsp. *equi* fermentam açúcares (GRANT et al., 1993), dificultando assim
129 a diferenciação fenotípica desses agentes. *Kits* comerciais de fermentação de açúcares em
130 microplaca, como o API 20 STREP (BioMérieux, França) também vêm sendo utilizados
131 como uma alternativa de alto poder discriminatório (MORAES, 2008). Acredita-se que o *S.*
132 *equi* subsp. *equi* possa ter evoluído do ancestral *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, associado a
133 doenças em equinos e outras espécies animais, incluindo o homem (HOLDEN et al., 2009).

134 Pela ocorrência de problemas com a diferenciação fenotípica entre as subespécies de
135 *S. equi*, os métodos moleculares para a caracterização destes vêm conquistando espaço, como
136 o emprego de sequenciamento parcial e análise do gene *hsp60* (*heat shock protein*) utilizado

137 para identificação das subespécies do agente (SILVA et al., 2007); a técnica da reação da
138 polimerase em cadeia (PCR) baseada na caracterização da região hipervariável da proteína M
139 (WALKER & TIMONEY, 1998); o sequenciamento de regiões intergênicas do gene 16S-23S
140 (CHANTER et al., 1997); polimorfismo associado à amplificação aleatória de fragmentos de
141 DNA mediante PCR (RAPD-PCR) (DUARTE et al., 2004); eletroforese em campo pulsado
142 (PFGE) e PCR multiplex com uso de sete a oito pares de *primers* simultaneamente, onde o
143 tamanho de cada *amplicon* caracteriza cada espécie de *Streptococcus* (KAWATA et al.,
144 2004).

145 *S. equi* subsp. *equi* produz uma variedade de fatores de virulência que auxiliam na
146 patogenia da enfermidade, como cápsula de ácido hialurônico, hialuronidase, estreptolisina,
147 estreptoquinase, receptores para Fc de IgG, proteína M antifagocítica, endopeptidases,
148 exotoxinas pirogênicas, além de outras proteínas extracelulares que auxiliam na aderência às
149 células-alvo do hospedeiro (TIMONEY, 2004), essenciais para o estabelecimento da doença.
150 HARRINGTON (2002) agrupou esses fatores de virulência de acordo com suas funções: I- os
151 que promovem a aderência bacteriana, II- aqueles que contribuem para a evasão do sistema
152 imune e III- os envolvidos na aquisição de nutrientes, porém alguns fatores desempenham
153 múltiplas funções no estabelecimento da doença, sendo difícil enquadrá-los em categorias
154 específicas. O objetivo desta revisão foi descrever os fatores de virulência de *S. equi* subsp.
155 *equi* enfatizando os seus potenciais biotecnológicos.

156

157 **2- Fatores de virulência de *Streptococcus equi* subsp. *equi***

158 Dentre os fatores de virulência de *S. equi*, a proteína M (SeM), codificada pelo gene
159 *SeM*, tem especial importância por ser uma proteína de membrana com capacidade
160 antifagocítica e de aderência, possuindo aspecto de fímbria que se projeta a partir da parede
161 celular. Ela tem sido associada ao aumento da virulência em comparação ao ancestral *S.*

162 *zooepidemicus* (GALAN & TIMONEY, 1987; TIMONEY, 2004; WALLER & JOLLEY,
163 2007). A presença da proteína SeM em *S. equi* foi primeiramente sugerida por BAZELY et al.
164 (1949), através da utilização de extratos ácidos oriundos de culturas puras para induzir
165 anticorpos protetores em camundongos e cavalos. Esta observação foi posteriormente
166 confirmada por MOORE & BRYANS (1970), WOOLCOCK (1974) e ERICKSON &
167 NORCROSS (1975). Após purificação e caracterização de proteína SeM extraída com auxílio
168 de mutanolisina, GALAN & TIMONEY (1987) demonstraram que a proteína SeM nativa é
169 produzida como um dímero ou trímero, com massa molecular variando de 54 kDa a 58 kDa. É
170 composta por uma região N-terminal variável, repetições centrais conservadas e um domínio
171 C terminal rico em prolina, sendo que dois terços dessa região possui uma estrutura α -hélice
172 superenrolada que compartilha sequências similares com a proteína SzM de *S. zooepidemicus*
173 (KELLY et al., 2006; WALLER et al., 2011). A região N-terminal não compartilha a mesma
174 estrutura e é única em *S. equi* (TIMONEY et al., 1997; WALLER et al., 2011).

175 Com capacidade de se ligar ativamente ao fibrinogênio, SeM é conhecida como
176 proteína ligante de fibrinogênio (FgBP), a qual ocorre através de resíduos localizados na
177 extremidade N-terminal (MEEHAN et al., 2000). Esta interação esconde os sítios para ligação
178 de C3b na superfície da bactéria, reduzindo assim a taxa de fagocitose, de forma semelhante
179 aos *Streptococcus* pertencentes ao Grupo A de Lancefield (BOSSCHWITZ & TIMONEY,
180 1994; WALLER et al., 2011). Além disso, a SeM é capaz de se ligar aos fragmentos Fc de
181 IgG, principalmente às subclasses IgG4 e IgG7 na região interdomínio CH2-CH3 da IgG. Tal
182 ligação ocorre com resíduos localizados na região central entre as repetições A e B da
183 proteína sendo capaz de romper a ativação do complemento mediada por anticorpos sugerindo
184 outro mecanismo pelo qual SeM pode mediar a resistência à fagocitose, comprometendo
185 assim a resposta imune do hospedeiro (MEEHAN et al., 2002; LEWIS et al., 2008; WALLER
186 et al., 2011).

187 A cápsula de ácido hialurônico é um polímero de alta massa molecular sendo formado
188 por resíduos de N-acetilglucosamina e ácido glicurônico e é responsável por conferir aspecto
189 mucoso às colônias e maior virulência a isolados que a produzem (TIMONEY, 2004). A sua
190 característica antifagocítica é capaz de reduzir significativamente a quantidade de patógeno
191 que fica associado à superfície de neutrófilos para ser digerido e morto posteriormente, e é
192 também essencial para a funcionalidade de proteínas, como a SeM e de proteínas hidrofóbicas
193 de superfície, auxiliando na manutenção da conformação. Como a cápsula aumenta a carga
194 negativa e a hidrofiliabilidade bacteriana, se produz um ambiente protetor contra a atividade de
195 proteases sensíveis ao oxigênio e toxinas, tais como estreptolisina S. Sua síntese é controlada
196 pelo *operon* composto por hialuronidase sintetase (*hasA*), glicose desidrogenase (*hasB*) e
197 glicose pirofosforilase (*hasC*). Deleções em *hasA* ou *hasB* acarretam na perda da síntese da
198 cápsula e conseqüentemente da virulência (WALKER & TIMONEY, 2002; TIMONEY,
199 2004).

200 A enzima hialorunidase, possui massa molecular de 55 kDa, hidrolisa o ácido
201 hialurônico auxiliando na penetração das mucosas e difusão tecidual, permitindo assim a
202 disseminação do patógeno a partir do local inicial da infecção, uma vez que o ácido
203 hialurônico é componente abundante na maioria dos tecidos conjuntivos (HYNES &
204 WALTON, 2000; HARRINGTON et al., 2002). A produção de hialorunidase é relatada em
205 *Streptococcus* dos grupos A, B, C e G (GUNTHER et al., 1996). Uma característica comum
206 em todas as hialorunidasas de *Streptococcus* é a presença de uma fenda que serve para
207 acomodar o substrato. Com a presença desta fenda a enzima assume uma visão de barril
208 composta por α -hélices interna e externamente. A ligação do ácido hialurônico é facilitada
209 pela fenda na região entre as hélices localizada na região mais larga do barril (LI et al., 2000;
210 STERN & JEDRZEJAS, 2006). Esta enzima apresenta quatro domínios, os quais são
211 compostos por um domínio N-terminal com carboidratos de ligação, um espaçador seguido

212 por um catalisador e um domínio C-terminal. A enzima está ancorada à superfície da bactéria
213 por ligações covalentes. Bacteriófagos que infectam duas espécies de *Streptococcus* (*S. equi* e
214 *S. pyogenes*) codificam hialuronidase, uma vez que para penetrar a célula do hospedeiro
215 precisam passar pela cápsula. Não foi identificada atividade de hialuronidase no meio
216 extracelular dessas duas espécies infectadas pelos bacteriófagos, sugerindo que a enzima é
217 parte da molécula do bacteriófago (HYNES et al., 1995; HYNES & WALTON, 2000).

218 Estreptolisina S (SLS), produzida por *S. equi* e *S. zooepidemicus*, é uma citolisina
219 secretada, oxigênio estável, não imunogênica e é responsável pela β -hemólise característica
220 das colônias sendo composta por um polipeptídeo associado a uma segunda molécula,
221 essencial para a sua atividade biológica, que pode ser RNA, albumina e em sistemas modelo,
222 um detergente como Tween (ALOUF, 1980; FLANAGAN et al., 1998). Essa proteína é quase
223 idêntica a estreptolisina produzida pela maioria das cepas de *S. pyogenes* tendo efeito
224 citopático direto em muitas células do hospedeiro, incluindo a inibição de várias funções das
225 células fagocíticas, contribuindo para a evasão da resposta imune e auxiliando também a
226 translocação do microorganismo através do epitélio (ALOUF, 1980; FONTAINE et al., 2003;
227 WALLER et al., 2011). A estreptolisina tem a capacidade de se ligar aos eritrócitos
228 resultando na formação de poros transmembrana causando lise osmótica irreversível da célula
229 (CARR, et al., 2001; TIMONEY, 2004). FONTAINE et al. (2003) promoveram a exclusão
230 dos genes para estreptolisina O (SLO) e SLS no sorotipo M5 de *S. pyogenes* cepa Manfredo,
231 sozinho ou em combinação, mostrando a redução nas fases iniciais da infecção e indução de
232 necrose por *S. pyogenes* em camundongos infectados por via subcutânea, mostrando que cada
233 gene atua como fator de virulência.

234 A estreptoquinase é uma proteína secretada por muitas cepas de *Streptococcus* e
235 interage com o domínio C-terminal da serina protease do plasminogênio formando plasmina
236 ativa, que hidrolisa fibrina e proporciona assim a disseminação e invasão tecidual pelo agente.

237 Outra função desta proteína é a ativação do complemento e produção de substratos
238 nitrogenados que favorecem o crescimento bacteriano (TIMONEY, 2004).

239 Em 2003, LANNERGARD et al. descreveram uma proteína de superfície celular do *S.*
240 *equi* denominada CNE, com 657 aminoácidos, a qual possui a propriedade de ligar colágeno,
241 e apresenta significativa semelhança com a proteína CNA de *Staphylococcus aureus*,
242 sugerindo o reconhecimento como outro fator de virulência. Outra proteína com capacidade
243 de ligar colágeno é a SclC descrita por KARLSTRÖM et al. (2006), com 302 aminoácidos, no
244 entanto, o gene que codifica para esta proteína foi identificado tanto na subsp. *equi* quanto na
245 *zooepidemicus*. Além disso, anticorpos anti-SclC foram encontrados em soros de animais sem
246 histórico de adenite e em níveis superiores nos animais que estavam convalescendo, dando
247 indícios de que esta proteína é produzida durante a infecção.

248 Duas proteínas extracelulares, FNE (30 kDa), proteína ligante de fibronectina que
249 ocorre na forma truncada na subsp. *equi* e é capaz de ligar colágeno (LINDMARK et al.,
250 2001; LANNERGARD et al., 2006), a SFS (40 kDa), proteína ligante de fibronectina
251 (LINDMARK & GUSS., 1999), são importantes adesinas do agente. A capacidade de ligação
252 à fibronectina é descrita para várias bactérias como *Staphylococcus* coagulase-positiva e
253 *Streptococcus* dos grupos sorológicos A, B, C e G (LANNERGARD et al., 2005).
254 LANNERGARD et al. (2005) descreveram uma nova proteína, denominada FNEB, com 475
255 aminoácidos, e comparou com SFS e FNE a especificidade de ligação e resposta imunológica
256 em cavalos mostrando que SFS e FNE se ligam ao mesmo domínio da fibronectina, enquanto
257 a FNEB reconhece um domínio distinto. O estudo sorológico de animais que sofrem com
258 adenite, bem como infecção experimental em camundongos, mostraram que FNEB é expressa
259 durante a infecção, resultando numa resposta de anticorpos IgG.

260 Uma IgG endopeptidase foi identificada em cepas de *S. equi* e denominada IdeE (IgG-
261 degrading enzyme of *S. equi* subsp. *equi*) com atividade antifagocítica. Esta proteína havia

262 sido descrita apenas em *Streptococcus* pertencentes ao grupo A de Lancefield
263 (LANNERGARD & GUSS, 2006; TIMONEY et al., 2008). HULTING et al. (2009) isolaram
264 e caracterizaram uma segunda endopeptidase extracelular responsável pela degradação
265 adicional de IgG expressa por *S. equi* e denominada IdeE2, semelhante a IdeE e IdeZ (*S.*
266 *zooepidemicus*).

267 Uma pequena proteína secretada por *S. equi* denominada Se18.9 inibe a via alternativa
268 do sistema complemento ao ligar-se ao fator H, sendo que este atua como regulador dessa via.
269 Ela atua como co-fator para fatores de clivagem da proteína C3b inibindo a formação da
270 enzima conversora de C3 e acelerando a sua dissociação (TIWARI et al., 2007). HOLDEN et
271 al. (2009) mostraram que 26 cepas de *S. equi* a produziram, enquanto apenas 1 de 140 cepas
272 de *S. zooepidemicus* avaliadas apresentaram a proteína, sendo um indicio de que este gene
273 (*Se18.9*) foi importante para a evolução de *S. equi*.

274 HOLDEN et al. (2009) analisaram os genomas de *S. equi* e *S. zooepidemicus* e
275 encontraram evidências de troca genética horizontal entre *S. equi*, *S. zooepidemicus* e *S.*
276 *pyogenes*, o que afeta a patogenicidade dessas bactérias. Há dois prófagos em *S. equi* que
277 codificam para quatro superantígenos SeeI, SeeL, SeeM e SeeH que compartilham alta
278 homologia com as toxinas mitogênicas de *S. pyogenes* pertencente ao grupo A de Lancefield.
279 O prófago Φ SEQ3 tem sequências de codificação para SeeM [SPE-M(Se)] e SeeL [SPE-
280 L(Se)] (SMOOT et al., 2002), enquanto Φ SEQ4 possui sequências para SeeH (SePE-H) e
281 SeeI (SePE-I) já caracterizadas anteriormente por ARTUSHIN et al. (2002), que
282 demonstraram que estas conferiam maior virulência à bactéria. As exotoxinas pirogênicas de
283 *S. pyogenes* têm uma alta capacidade imunomoduladora, sendo caracterizadas como
284 superantígenos (sAgs), pois são capazes de estimular a proliferação de linfócitos T não
285 específicos, gerando uma resposta pro-inflamatória (SRISKANDAN et al., 2007; PAILLOT
286 et al., 2010). A ativação de superantígenos dependentes de células T resulta na ativação e

287 liberação descontrolada de mediadores pró-inflamatórios e citocinas, incluindo fator de
288 necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), IL-6 e interferon gamma (IFN- γ)
289 (NORRBY-TEGLUND, 1994). PAILLOT et al. (2010) investigaram a atividade, *in vitro*, dos
290 antígenos recombinantes de *S. equi* e sobrenadante de cultivo de *S. equi* em células
291 mononucleares do sangue periférico de eqüinos (PBMC), avaliaram o impacto da exclusão
292 seqüencial ou total de genes dos sAgs na ativação de células T em comparação com *S. equi*
293 selvagem e por fim quantificaram a cinética da resposta imune contra os sAgs de cavalos em
294 convalescença e a capacidade de seus soros em neutralizar a atividade desses sAgs *in vitro*.
295 Dos quatro antígenos produzidos por *S. equi*, três deles (SeeI, SeeL e SeeM) induzem a
296 proliferação de PBMC e síntese de IFN- γ *in vitro* e quando esses genes são deletados há
297 anulação da linfoproliferação e síntese de IFN- γ . Por fim cavalos naturalmente infectados
298 desenvolveram uma resposta de anticorpos com atividade neutralizante limitada.

299

300 **3- Aplicação biotecnológica dos fatores de virulência de *S. equi***

301 O potencial biotecnológico de muitos dos fatores de virulência de *S. equi* vem sendo
302 amplamente estudado para o desenvolvimento de vacinas e métodos de diagnóstico eficazes e
303 muitos trabalhos apresentam perspectivas promissoras.

304 A SeM por ser uma proteína de fundamental importância na patogenia de *S. equi* vem
305 sendo utilizada para diagnóstico e é candidata promissora a antígeno vacinal. O Centro de
306 Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas produziu a proteína SeM recombinante
307 (rSeM), a qual foi utilizada em testes de diagnóstico e imunização de camundongos, obtendo
308 resultados promissores (MORAES, 2008). SHEORAN et al. (2002) testaram uma vacina
309 composta por uma mistura de proteína M ligada à toxina colérica por via nasal e obtiveram
310 indução da resposta específica de anticorpos IgG e IgA no soro e mucosa, respectivamente,
311 porém clinicamente os resultados não foram eficazes, uma vez que os animais não resistiram

312 ao desafio com *S. equi*. NALLY et al. (2001) usaram o peptídeo imunogênico SeMF3
313 juntamente com sucrose acetato isobutirato (SAIB) como veículo para administração nasal em
314 cavalos. Os resultados mostraram que o peptídeo administrado sozinho gerou pouca resposta
315 imune de mucosa e nenhuma sistêmica, já com a utilização do veículo houve uma melhora na
316 resposta imune.

317 Uma mutação específica do gene da hialuronidase sintetase inibiu a síntese da cápsula
318 de ácido hialurônico, promovendo a atenuação da cepa Pinnacle usada como vacina intranasal
319 (Fort Dodge Animal Health, USA). Foi ainda capaz de fornecer um marcador genético
320 facilmente reconhecível por PCR, possibilitando assim diferenciar os animais infectados dos
321 vacinados (WALKER & TIMONEY, 2002).

322 Além da SeM muitas outras proteínas de *S. equi* estão sendo avaliadas e alguns
323 trabalhos mostram resultados promissores. FLOCK et al. (2004) desenvolveram uma vacina
324 recombinante composta por partes das proteínas FNZ, SFS e EAG, proteína ligante de α_2
325 macroglobulina, albumina e imunoglobulina G, respectivamente. A vacina produzida foi
326 avaliada em camundongos e a resposta de anticorpos contra esses antígenos foi estudada em
327 cavalos convalescentes, sem histórico de adenite e cavalos experimentalmente imunizados. Os
328 cavalos com histórico recente de adenite tiveram níveis elevados de anticorpos contra esses
329 antígenos em relação aos que não tinham histórico da doença. Os animais vacinados
330 mostraram níveis satisfatórios de IgA e IgG quando administradas pelas vias nasal e
331 subcutânea, além de apresentar um efeito sinérgico quando utilizadas em conjunto. Outra
332 vacina composta pelos antígenos recombinantes EAG, ScIC e CNE (Trivacc) foi testada em
333 pôneis, demonstrando proteção parcial contra desafio com *S. equi*. A quantidade de secreção
334 nasal, o número de bactérias recuperadas em lavagens nasais e de material de abscesso
335 apresentaram redução significativa entre o grupo vacinado e o grupo controle (WALLER et
336 al., 2007).

337 Duas IgG endopeptidases, IdeE e IdeE2, foram utilizadas para imunizar camundongos
338 por via nasal. IdeE2 foi capaz de reduzir significativamente, em infecção experimental, o
339 crescimento de *S. equi* e também a perda de peso nos animais, tornando-a um antígeno
340 promissor para o desenvolvimento de vacinas (HULTING, 2009).

341 Sabe-se que a utilização de sistemas experimentais podem não reproduzir um caso real
342 de infecção, no entanto trabalhos mostram que antígenos capazes de proteger camundongos
343 foram também capazes de proteger cavalos submetidos à infecção experimental (WALLER et
344 al., 2007). GUSS et al. (2009) testaram sete antígenos recombinantes (Septavacc), escolhidos
345 a partir de resultados preliminares obtidos em modelos experimentais, onde 5 destes antígenos
346 são parte da superfície de *S. equi* e já mencionados anteriormente (EAG, CNE, ScIC e
347 proteínas com características de proteínas de superfície codificadas pelos genes: *SEQ0256* e
348 *SEQ0402*) e duas IgG endopeptidases (IdeE e IdeE2). Os resultados obtidos neste trabalho
349 mostraram uma proteção de 85%, sendo que apenas um dos animais vacinados com Septavacc
350 apresentou formação de abscessos.

351 A caracterização da Se18.9 produzida por *S. equi*, mostrou que é imunorreativa com
352 soro de animal convalescente e IgA de mucosa. Essa característica confere a Se18.9 potencial
353 para imunodiagnóstico e estudo da resposta imune de mucosa contra *S. equi* (TIWARI et al.,
354 2007).

355

356 **4- Conclusão**

357 O estudo e a caracterização dos fatores que contribuem para a virulência de
358 *Streptococcus equi* subsp. *equi* podem auxiliar o desenvolvimento de vacinas e métodos
359 diagnósticos mais eficientes, melhorando o controle da Adenite Equina e consequentemente
360 diminuindo os gastos para o produtor.

361

362 **5- Referências bibliográficas**

363

364 AINSWORTH, D.M.; BILLER, D.S. Sistema Respiratório. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M.
365 **Medicina Interna Equina.** Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, p.229-230,
366 2000.

367

368 ALOUF, J. Streptococcal toxins (streptolysin O, streptolysin S, erythrogenic toxin).
369 **Pharmacology and Therapeutics**, n.11, p.661-717, 1980.

370

371 ARTIUSHIN, S.C. et al. Characterization and immunogenicity of pyrogenic mitogens SePE-
372 H and SePE-I of *Streptococcus equi*. **Microbial Pathogenesis**, n.32, p.71-85, 2002.

373

374 BOSCHWITZ, J.S.; TIMONEY, J.F. Characterization of the antiphagocytic activity of equine
375 fibrinogen for *Streptococcus equi* subsp. *equi*. **Microbial Pathogenesis**, n.17, p.121-129,
376 1994.

377

378 CARR, A. Similarities between complement-mediated and streptolysin S-mediated
379 hemolysis, **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.45, p.41790-41796, 2001.

380

381 CHANTER, N. Streptococci and enterococci as animal pathogens. **Journal of Applied**
382 **Microbiology**, n.83, p.1005-1095, 1997.

383

384 DUARTE, R.S. et al. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae*
385 isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**,
386 v.42, n.9, p.4214-4222, 2004.

- 387 ERICKSON, E.D.; NORCROSS, N.L. The cell surface antigens of *Streptococcus equi*.
388 **Canadian Journal of Comparative Medicine**, n.39, p.110-115, 1975.
389
- 390 FACKLAM, R. What happened to the Streptococci: Overview of taxonomic and
391 nomenclature changes, **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.4, p.613-630, 2002.
392
- 393 FLANAGAN, J. et al. Characterization of the haemolytic activity of *Streptococcus equi*.
394 **Microbial Pathogenesis**, n.24, p.211-221, 1998.
395
- 396 FLOCK, M. et al. Recombinant *Streptococcus equi* proteins protect mice in challenge
397 experiments and induce immune response in horses. **Infection and Immunity**, v.72, n.6,
398 p.3228-3236, 2004.
399
- 400 FONTAINE, M.C. et al. Combined contributions of streptolysin O and streptolysin S to
401 virulence of serotype M5 *Streptococcus pyogenes* strain Manfredo. **Infection and Immunity**,
402 n.71, p.3857-3865, 2003.
403
- 404 GALÁN, J.E.; TIMONEY, J.F. Molecular analysis of the M protein of *Streptococcus equi*
405 and cloning and expression of the M protein gene in *Escherichia coli*. **Infection and**
406 **Immunity**, v.55, n.12, p.3181-3187, 1987.
407
- 408 GRANT, S.T. et al. Laboratory diagnosis of strangles and the isolation of atypical
409 *Streptococcus equi*. **Veterinary Record**, v.133, p.215-216, 1993.
410

- 411 GUNTHER, E. et al. Occurrence of extracellular hyaluronic acid and hyaluronate lyase in
412 streptococci of groups A, B, C, and G. **Zentralblatt fur Bakteriologie**, v.285, p.64-73, 1996.
413
- 414 GUSS, B. et al. Getting to Grips with Strangles: An Effective Multi-Component Recombinant
415 Vaccine for the Protection of Horses from *Streptococcus equi* Infection. **PLoS Pathogens**,
416 v.5, n.9, 2009.
417
- 418 HARRINGTON, D.J. et al. The molecular basis of *Streptococcus equi* infection and disease.
419 **Microbes and Infection**, n.4, p.501-510, 2002.
420
- 421 HYNES, W.L. et al. Analysis of a second bacteriophage hyaluronidase gene from
422 *Streptococcus pyogenes*: evidence for a third hyaluronidase involved in extracellular
423 enzymatic activity. **Infection and Immunity**, n.63, p.3015-3020, 1995.
424
- 425 HYNES, W.L.; WALTON, S.L. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. **FEMS**
426 **Microbiology Letters**, n.183, p.201-207, 2000.
427
- 428 HOLDEN M.T. et al. Genomic Evidence for the Evolution of *Streptococcus equi*: Host
429 Restriction, Increased Virulence, and Genetic Exchange with Human Pathogens. **PLoS**
430 **Pathogens**, v.5, n.3, p.1-14, 2009.
431
- 432 HULTING, G. et al. Two novel IgG endopeptidases of *Streptococcus equi*. **FEMS**
433 **Microbiology Letters**, n.298, p.44-50, 2009.
434

- 435 KARLSTRÖM, A. et al. SclC is a member of a novel family of collagen-like proteins in
436 *Streptococcus equi* subspecies *equi* that are recognised by antibodies against SclC.
437 **Veterinary Microbiology**, n.114, p.72-81, 2006.
- 438
- 439 KAWATA, K. et al. Simple and rapid PCR method for identification of streptococcal species
440 relevant to animal infections based on 23S rDNA sequence. **FEMS Microbiology Letters**.
441 n.237, p.57-64, 2004.
- 442
- 443 KELLY, C. et al. Sequence variation of the SeM gene of *Streptococcus equi* allows
444 discrimination of the source of strangles outbreaks. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44,
445 p.480-486, 2006.
- 446
- 447 KUWAMOTO, Y. et al. Microplate sugar-fermentation assay distinguishes *Streptococcus*
448 *equi* from other streptococci of Lancefield's group C. **Equine Veterinary Science**, v.12, n.2,
449 p.47-49, 2001.
- 450
- 451 LANNERGARD, J. et al. CNE, a collagen-binding protein of *Streptococcus equi*. **FEMS**
452 **Microbiology Letters**, n.222, p.69-74, 2003.
- 453 LANNERGARD, J. et al. Studies of Fibronectin-Binding Proteins of *Streptococcus equi*.
454 **Infection and Immunity**, v.73, n.11, p.7243-7251, 2005.
- 455
- 456 LANNERGARD, J.; GUSS, B. IdeE, an IgG-endopeptidase of *Streptococcus equi* ssp. *equi*.
457 **FEMS Microbiology Letters**, n.262, p.230-235, 2006.
- 458

459 LEWIS, M. et al. A Common Theme in Interaction of Bacterial Immunoglobulin-binding
460 Proteins with Immunoglobulins Illustrated in the Equine System. **Journal of Biological**
461 **Chemistry**, v.283, n.25, 2008.

462

463 LI S. et al. Structural basis of hyaluronan degradation by *Streptococcus pneumoniae*
464 hyaluronate lyase. **EMBO Journal**, n.19, p.1228-40, 2000.

465

466 LINDMARK, H.; GUSS, B. SFS, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus*
467 *equi*, inhibits the binding between fibronectin and collagen. **Infection and Immunity**, v.67,
468 n.5, p.2383-2388, 1999.

469

470 LINDMARK, H. et al. Comparison of fibronectin-binding protein FNE from *Streptococcus*
471 *equi* with FNZ from *S. equi* subspecies *zooepidemicus*, reveals a major and conserved
472 difference. **Infection and Immunity**, v.69, n.5, p.3159-3163, 2001.

473

474 MAPA- Ministério da Agricultura pecuária e desenvolvimento, disponível em:
475 <www.agricultura.gov.br> acesso em: 21 maio 2011.

476

477 MEEHAN, M. et al. Localization and characterization of the ligand-binding domain of the
478 fibrinogen-binding protein (FgBP) of *Streptococcus equi* subsp. *equi*. **Microbiology**, n.146,
479 p.1187-1194, 2000.

480

481 MEEHAN, M. et al. The C terminal portion of the fibrinogen-binding protein of
482 *Streptococcus equi* subsp. *equi* contains extensive α -helical coiled-coil structure and
483 contributes to thermal stability. **FEMS Microbiology**, n.206, p.81-86, 2002.

484 MOORE, B.O.; BRYANS, J.T. Type specific antigenicity of group C streptococci from
485 disease of the horse. In: **Proceedings of the Second International Conference on Equine**
486 **Infectious diseases**, S. Karger: Basel, 1970, p.231-238.

487

488 MORAES, C.M. **Produção e avaliação de proteína SeM recombinante para o controle de**
489 **Adenite Equina**. 2008. 79f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)- Curso de Pós-graduação em
490 Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

491

492 NALLY, J.E. et al. Induction of mucosal and systemic antibody specific for SeMF3 of
493 *Streptococcus equi* by isobutirate based delivery system. **Vaccine**, n.19, p.492-497, 2001.

494

495 NORRBY-TEGLUND, A. et al. Similar cytokine induction profiles of a novel streptococcal
496 exotoxin, MF, and pyrogenic exotoxins A and B. **Infection and Immunity**, n.62 p.3731-
497 3738, 1994.

498

499 PAILLOT, R. et al. Contribution of each of Four Superantigens to *Streptococcus equi*-
500 Induced Mitogenicity, Gamma Interferon Synthesis, and Immunity. **Infection and Immunity**,
501 v.78, n.4, p.1728-1739, 2010.

502

503 SHEORAN, A.S. et al. Nasal mucosal immunogenicity for the horse of SeM peptide of
504 *Streptococcus equi* genetically coupled to cholera toxin. **Vaccine**, n.20, p.1653-1659, 2002.

505

506 SILVA, M. S. et al. Phenotypical assays and parcial sequencing of the *hsp60* gene for
507 identification of *Streptococcus equi*. **Current Microbiology**, v.54, p.331-334, 2007.

- 508 SRISKANDAN, S. et al. *Streptococcus pyogenes*: insight into the function of the
509 streptococcal superantigens. **International Journal of Biochemistry Cell Biology**, n.39,
510 p.12-19, 2007.
- 511
- 512 STERN, R.; JEDRZEJAS, M.J. The Hyaluronidases: Their Genomics, Structures, and
513 Mechanisms of Action. **Chemical Reviews**, v.106, n.3, p.818-839, 2006.
- 514
- 515 SWEENEY, C.R. *Streptococcus equi*. In: SMITH, B.P. **Tratado de Medicina Interna de**
516 **Grandes Animais**. Editora Manole LTDA, São Paulo, p.531-533, 1993.
- 517 SWEENEY, C.R.; TIMONEY, J.F.; NEWTON, J.R.; HINES, M.T. *Streptococcus equi*
518 infections in horses: guidelines for treatment, control, and prevention of strangles. **Journal of**
519 **veterinary internal medicine**, n.19, v.1, p.123- 134, 2005.
- 520
- 521 TIMONEY, J.F. et al. Comparison of the sequences and functions of *Streptococcus equi* M-
522 like proteins SeM and SzPSe. **Infection and Immunity**, n.65, p.3600-3605, 1997.
- 523
- 524 TIMONEY, J.F. The pathogenic equine streptococci. **Veterinary Research**, v.35, p.397- 409,
525 2004.
- 526
- 527 TIMONEY, J.F. et al. IdeE reduce the bactericidal activity of equine neutrophils for
528 *Streptococcus equi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n.122, p.76-82, 2008.
- 529
- 530 TIWARI, R. et al. Se18.9, an anti-phagocytic factor H binding protein of *Streptococcus equi*.
531 **Veterinary Microbiology**, n.121, p.105-115, 2007.
- 532

- 533 WALKER, J.A.; TIMONEY, J. F. Molecular basis of variation in protective SzP proteins of
534 *Streptococcus zooepidemicus*. **American Journal of Veterinary Research**, v.59, p.1129-
535 1133, 1998.
- 536
- 537 WALKER, J.A.; TIMONEY, J.F. Construction of a stable non-mucoid deletion mutant of the
538 *Streptococcus equi* Pinnacle vaccine strain. **Veterinary Microbiology**, n.89, p.311-321, 2002.
- 539
- 540 WALLER, A. S.; JOLLEY, K. A. Getting a grip on strangles: recent progress towards
541 improved diagnostics and vaccines. **The Veterinary Journal**, v.173, p.492-501, 2007.
- 542
- 543 WALLER, A. et al. Vaccination of horses against strangles using recombinant antigens from
544 *Streptococcus equi*. **Vaccine**, n.25, p.3629-3635, 2007.
- 545
- 546 WALLER, A.S. et al. *Streptococcus equi*: a pathogen restricted to one host. **Journal of**
547 **Medical Microbiology**, n.60, p.1231-1240, 2011.
- 548
- 549 WOOLCOCK, J. B. Purification and antigenicity of an M-like protein of *Streptococcus equi*.
550 **Infection and Immunity**, n.10, p.116-122, 1974.
- 551
- 552

3. Trabalho 2

Avaliação da imunogenicidade de proteína M recombinante de *Streptococcus equi* subsp. *equi* co-administrada com a subunidade B recombinante da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*

MACIEL, L.F., DUMMER, L.A., STURBELE, R.T., ROSA, M.C., MAGALHÃES, C., MORAES, C., LEITE, F.P.L., CONCEIÇÃO, F.R*

Centro de Desenvolvimento Tecnológico - Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, CP 354, 96010900, Pelotas, RS, Brazil.

*Autor para correspondência: fabricao.rochedo@ufpel.edu.br

RESUMO

A Adenite Equina é uma doença infecciosa que pode acometer animais de todas as idades, causando perdas econômicas importantes na equinocultura. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma vacina composta de proteína M recombinante de *Streptococcus equi* subsp. *equi* (rSeM) co-administrada com a subunidade B recombinante da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (rLTB) e avaliar a sua inocuidade e imunogenicidade em camundongos e cavalos. Foram utilizados 72 camundongos Balb/c fêmeas divididos em 8 grupos e 18 cavalos divididos em 6 grupos. Ambas as espécies foram inoculadas por via intramuscular ou intranasal com diferentes tratamentos contendo rSeM, rLTB e/ ou Al(OH)₃. Os resultados obtidos tanto na avaliação dos camundongos quanto dos cavalos mostraram que a rSeM foi inócua e imunogênica por si só, aumentando os níveis de imunoglobulinas (Igs) séricas e secretórias específicas sem a necessidade de adição de qualquer adjuvante imunológico. Os adjuvantes rLTB e Al(OH)₃ não foram capazes de incrementar significativamente os títulos de Igs séricas totais anti-rSeM em camundongos, enquanto em cavalos o tratamento rSeM + rLTB (IM) promoveu um aumento significativo no título sérico de IgG anti-rSeM. Interessantemente, em cavalos, o tratamento rSeM + Al(OH)₃ (IM) estimulou níveis significativos de IgA secretora anti-rSeM no trato respiratório superior. A vacina composta por rSeM co-administrada com rLTB pode ser uma ferramenta útil no controle da Adenite Equina.

Palavras-chave: Adenite Equina, Garrotilho, vacina, rSeM, rLTB.

Immunogenicity evaluation of the recombinant M protein from *Streptococcus equi* subsp. *equi* co-administered with the recombinant Heat-labile enterotoxin B subunit from *Escherichia coli*

ABSTRACT

The equine adenitis is an infectious disease which affects horses from all ages and causes important economic losses in the equine related business. The aim of this research was the development of a vaccine composed by the recombinant M protein from *Streptococcus equi* subsp. *equi* (rSeM) co-administered with the recombinant Heat-labile enterotoxin B subunit from *Escherichia coli* (rLTB), and evaluates its innocuity and immunogenicity in both mice and horses. A total of 72 female BALB/c were divided into eight groups and 18 horses into six groups. Both species were inoculated by intramuscular (IM) or intranasal (IN) routes with different treatments containing rSeM, rLTB and/or Al(OH)₃. The results obtained in the evaluation of mice and horses showed that the rSeM alone, without the addition of any immunological adjuvant, was innocuous and immunogenic, resulting in an increase in the titers of both specific secretory and seric immunoglobulin. The immunological adjuvant rLTB and Al(OH)₃ were not capable to increase significantly the titers of anti-rSeM antibodies in mice. However, in horses treated with rSeM + rLTB (IM), a significant increase in the titers of seric anti-rSeM IgG was observed. Interestingly, horses inoculated with rSeM + Al(OH)₃ (IM) showed a significant increase in the titers of secretory anti-rSeM IgA in the upper respiratory tract. Thus, the vaccine composed by rSeM co-administered with rLTB could be a useful tool in the equine distemper control.

Keywords: Equine Adenitis, Strangle, vaccine, SeM, LTB.

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio do cavalo ocupa atualmente importante posição no cenário nacional, principalmente nos setores ligados ao lazer, cultura e turismo, sendo responsável pela geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (MAPA, 2011). Contrapondo a realidade de crescimento do setor, a ocorrência de doenças infecciosas gera perdas econômicas significativas aos criadores quando, torna-se necessário a interrupção do treinamento dos animais.

A Adenite Equina é uma doença contagiosa que afeta o trato respiratório superior dos equinos e é causada por *Streptococcus equi* subsp. *equi*, bactéria Gram-positiva, β -hemolítica e pertencente ao grupo C de Lancefield (TIMONEY, 2004). A enfermidade pode acometer equídeos de todas as idades, embora seja mais frequente em animais com menos de cinco anos de idade e, especialmente, em potros (AINSWORTH; BILLER, 2000). É uma das doenças mais prevalentes entre os equinos, apresentando baixa letalidade, porém, alta morbidade, o que tem grande relevância no que diz respeito a locais com grandes concentrações de equinos (SWEENEY et al., 2005).

S. equi subsp. *equi* produz uma variedade de fatores de virulência que auxiliam na patogenia, tais como cápsula de ácido hialurônico, hialuronidase, estreptolisina, estreptoquinase, receptores para Fc de IgG, endopeptidases, proteína M antifagocítica (SeM), além de outras proteínas extracelulares que auxiliam na aderência às células-alvo, sendo esta capacidade de se ligar à célula hospedeira um passo essencial no estabelecimento da doença (TIMONEY, 2004). A resposta imune induzida na doença espontânea é dirigida principalmente contra a SeM, tornando-a um antígeno de eleição para o desenvolvimento de vacinas mais eficientes (SHEORAN et al., 1997). Dentre a variedade de vacinas utilizadas para prevenir a Adenite Equina, há bacterinas que contém extratos da bactéria inativados e vacinas de subunidade que contém proteína M ou frações desta (WALLER; JOLLEY, 2007; MORAES et al., 2009), porém são pouco eficientes, reduzindo em 50% a severidade da doença (MORAES, 2005; WALLER; JOLLEY, 2007). Moraes (2008) demonstrou que a expressão heteróloga da SeM resultou em uma proteína recombinante antigênica e imunogênica e que foi capaz de induzir proteção em camundongos desafiados com uma cepa virulenta de *S. equi*.

Como a infecção pelo agente ocorre através da mucosa respiratória, uma adequada estimulação do sistema imune associado à mucosa seria estratégica, e para que isso ocorra, os antígenos devem ser administrados localmente. No entanto, antígenos aplicados dessa forma geralmente não são imunogênicos levando à tolerância imunológica (MCGHEE, 1992). A utilização de adjuvantes capazes de induzir imunidade de mucosa é uma alternativa a tolerância imunológica. Estudos recentes mostram resultados positivos em relação ao uso da subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) como um adjuvante imunológico (BRUM et al., 2008; DA HORA et al., 2011).

Desta forma, este estudo teve por objetivo desenvolver uma vacina composta de proteína M recombinante de *S. equi* subsp. *equi* (rSeM) co-administrada com a subunidade B recombinante da enterotoxina termolábil de *E. coli* (rLTB) e avaliar a sua inocuidade e imunogenicidade em camundongos e cavalos.

2. MATERIAI E MÉTODOS

2.1 Cultivo do *S. equi* e extração do DNA cromossomal

Uma cepa de *S. equi* isolada de um cavalo com garrotilho foi cultivada em meio infuso de cérebro-coração (BHI) acrescido de 1% de peptona a 37°C por 18h a 150 rpm. Após foi realizada extração do DNA cromossomal através do método descrito por Sambrook & Russell (2001).

2.2 Clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes

A sequência codificadora do antígeno SeM de *S. equi*, depositada no GenBank sob número de acesso U73162 foi amplificada por PCR. A digestão do inserto e do vetor de expressão (pAE) foi realizada com as enzimas de restrição *KpnI* e *BamHI*. O processo de clonagem foi feito de acordo com Sambrook & Russell (2001) e a seleção dos transformantes realizada em meio Luria-Bertani, acrescido de 100µg/mL de ampicilina. Os clones recombinantes contendo o inserto de interesse foram selecionados por “Microprep”, conforme descrito por JOUGLARD et al. (2005).

Células de *E. coli* BL21 (DE3) Star foram transformadas com os vetores recombinantes (pAE-SeM) por choque térmico. A expressão da SeM recombinante foi feita utilizando 0,3mM de IPTG, e levado ao agitador, por 3h a 37°C. Os cultivos

foram centrifugados a 10.000 x g por 20min e os *pellets* resultantes ressuspensos em tampão Tris-NaCl pH 8.0 e submetidos à SDS-PAGE e *Western blot* para verificar a expressão da proteína de interesse. Para expressão da LTB recombinante usou-se o vetor pAE-*ltb* (CONCEIÇÃO et al., 2003). A indução foi realizada conforme descrito anteriormente, com a utilização de IPTG 0,3mM. As células foram centrifugadas a 10.000 x g por 20min, ressuspensas em PBS pH 7.4 e submetidas a sonicação. Após a lise, os corpos de inclusão foram lavados 6 vezes com PBS (pH 7.4), este processo foi adotado tanto para rSeM quanto para rLTB. Para solubilização, os corpos de inclusão da rSeM foram ressuspensos em tampão contendo N-Lauryl sarcosine (100mM Tris, 200mM NaCl, 0,2% de N-Lauryl Sarcosine, pH 8.0) e incubados a 4°C sob agitação de 150rpm por 48h. Para a solubilização dos corpos de inclusão da rLTB utilizou-se tampão contendo uréia (100mM Tris, 200mM NaCl, 6M de uréia, pH 8.0) e incubou-se a 4°C sob agitação por 24h. Após esse período as amostras foram novamente centrifugados a 10.000 x g por 20min e o sobrenadante coletado. As proteínas recombinantes foram dialisadas em membrana de celulose para diálise (Sigma-Aldrich, Brasil) contra o mesmo tampão utilizado na solubilização, porém sem agente desnaturante. Ao final do processo as proteínas foram concentradas com polietilenoglicol (PEG) e quantificadas de acordo com o método de Bradford (1976).

2.3 Caracterização por SDS-PAGE e *Western blot*

A identificação dos clones recombinantes e caracterização das proteínas foi realizado após as amostras serem fervidas por 10min e separadas em SDS-PAGE 12%. Após a eletrotransferência para membrana de nitrocelulose 0,45µm (Hybond-C Extra, GE Healthcare, Brasil), foi realizado o bloqueio com solução de leite desnatado a 5% por 1h. Após 3 lavagens com PBS, acrescido de 0,5% de Tween 20 (PBS-T), a membrana foi incubada com anticorpo monoclonal (MAb) anti-6xHis (Sigma-Aldrich, Brasil) na diluição 1:10.000, durante 1h a temperatura ambiente. Após o período de incubação foram realizadas novas lavagens com PBS-T e adicionou-se o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich, Brasil) na diluição 1:6000 por 1h. Por fim, foi adicionada solução cromógena (9mL de Tris-HCl 50mM, 1mL de sulfato de níquel 0.3%, 10µL de peróxido de hidrogênio e 6mg 3.3-diaminobenzidine tetrahydrochloride). A reação foi interrompida após lavagens com água destilada.

2.4 Testes para conservação de rSeM

Para testar a forma mais adequada de conservação da rSeM foram realizados testes com diferentes condições. Alíquotas de 500µl contendo solução de rSeM foram separadas, onde: 1- manteve-se estocada a 4°C com adição de PMSF 1mM, 2- sob congelamento, 3- com adição de 4% de glicerol e estocada a 4°C, 4- adição de PMSF a 1mM sob congelamento, 5- adição de PMSF 1 mM e glicerol 4% sob congelamento, 6- liofilização do material (para liofilização foram adicionados PMSF 1mM e glicerol 4%) e 7- estocada a 4°C sem nenhum tratamento. Amostras da proteína, após quinze dias de conservação, foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 12%.

2.5 Imunização dos camundongos

Para avaliar a resposta imune foram utilizados 72 camundongos Balb/c fêmeas de 6-8 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da UFPel e divididos em 8 grupos descritos na tabela 1. Foram inoculadas três doses de 100µl, diluídas em solução salina, nos dias 0, 14 e 21 do experimento. Amostras de soro foram coletadas por punção do seio venoso retro-ocular nos dias 0, 7, 14, 21 e 42 pós-imunização. Os animais foram mantidos e manuseados de acordo com os requisitos legais previstos na Lei Nacional de Proteção aos Animais de Experimentação.

Tabela 1 - Tratamentos e doses para imunização de camundongos.

Grupo	Via de administração*	Tratamento	Dose	(n)**
1	IM	rSeM + Al(OH) ₃	25 µg + 10%	7
2	IM	rSeM + rLTB	25 µg + 10 µg	7
3	IM	rSeM + rLTB + Al(OH) ₃	25 µg + 10 µg + 10%	7
4	IM	rLTB + Al(OH) ₃	10 µg + 10%	7
5	IM	rSeM	25 µg	7
6	IN	rSeM	25 µg	15
7	IN	rSeM + rLTB	25 µg + 10 µg	13
8	IN	rLTB	10 µg	9

*Via intramuscular (IM) e via intranasal (IN). **n= número de animais por grupo

2.6 Avaliação da resposta imune humoral em camundongos

A avaliação da cinética de imunoglobulinas séricas específicas bem como a titulação (dia 42) foram realizadas mediante ELISA indireto utilizando como antígeno rSeM. Resumidamente, placas de poliestireno, com 96 cavidades, foram sensibilizadas com 100µl do antígeno (12µg/mL), diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 e mantidas a 4°C durante a noite. Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T. Inicialmente os soros foram diluídos 1:100 em PBS-T e, posteriormente, para titulação, foram utilizadas diluições de 1:200 até 1:145.800 para os grupos IM e de 1:40 até 1:320 para os grupos IN. Os soros em teste foram incubados a 37°C por 1,5h. Soro anti-IgG total de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich, Brasil) foi acrescentado na diluição 1:4000 e incubado a 37°C por 90 min. A reação foi revelada usando uma solução de orto fenil diamina (3,4mg em 10mL de tampão fosfato citrato) à qual foram adicionados 5µL de água oxigenada 30vol. A leitura da densidade ótica foi feita a 450nm em leitor de ELISA MR 700 (Dynatech Labs. Inc. Chantilly, VA, USA), 15min após adição do revelador. O título de anticorpos foi determinado como a recíproca da maior diluição com DO igual ou superior a do Cut-off (DO média do soro pré-imune acrescida de 2 desvios padrões).

2.7 Imunização dos cavalos

Antes da realização do experimento foi feito teste de inocuidade em 6 equinos cedidos pelo Hospital de Clínica Veterinária da UFPel. Foram elaboradas vacinas contendo 100µg de rSeM e 10% de Al(OH)₃. As doses com volume de 3mL foram aplicadas por via intramuscular e subcutânea. Os animais foram avaliados clinicamente por 15 dias e não apresentaram nenhuma reação à vacina contendo rSeM.

Para o experimento foram imunizados cavalos provenientes de uma propriedade particular, localizada no município de Canguçu (RS), com idades entre 7 meses a 13 anos, nos dias 0 e 28 por via intramuscular ou intranasal, conforme tabela 2. O volume das doses foi de 3mL para a via Intramuscular e 1mL para a via Intranasal (aplicada em spray) ambas diluídas em solução salina. O sangue foi coletado por punção da veia jugular nos dias 0, 28 e 42. Foram coletados *swabs* nasais e da língua para quantificação de IgA secretora e o material armazenado em solução de 5mM de EDTA, 1mM PMSF, 0,5% de gelatina, 0,05% de Tween 80 e 0,05% de NaN₃ diluído em PBS.

Tabela 2 - Tratamentos e doses para imunização dos cavalos.

Grupo	Via de administração*	Tratamento	Dose	(n)**
1	IM e IN	PBS	2 mL	4
2	IN	rSeM	100 µg	3
3	IM	rSeM	100 µg	2
4	IN	rSeM + rLTB	100 µg + 50 µg	2
5	IM	rSeM + rLTB	100 µg + 50 µg	4
6	IM	rSeM + Al(OH) ₃	100 µg + 15%	3

*Via intramuscular (IM) e via intranasal (IN). **n= número de animais por grupo.

2.8 Avaliação da resposta imune humoral em cavalos

A presença de anticorpos anti-rSeM em cavalos foi quantificada através de ELISA indireto. As placas de poliestireno, com 96 cavidades, foram sensibilizadas com 100µl de rSeM (6µg/mL), diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 e mantidas a 4°C durante a noite. Posteriormente, foi adicionado solução de bloqueio

(leite desnatado 5%) e as placas incubadas a 37°C por 1h. Para a titulação de anticorpos, foram feitas diluições de 1:1000 até 1:16.000. Soro anti-IgG de cavalo conjugado a peroxidase (SIGMA- Aldrich, Brasil) foi acrescentado na diluição 1:6000 por 90 min a 37°C. A reação foi revelada usando uma solução de orto fenil diamina (3,4mg em 10mL de tampão citrato) à qual foram adicionados 5µL de água oxigenada 30vol. A leitura da densidade ótica foi feita a 450nm em leitor de ELISA MR 700 (Dynatech Labs. Inc. Chantilly, VA, USA), 15min após adição do revelador.

Para avaliação de IgA secretora anti-rSeM, o material coletado dos *swabs* foi aplicado diretamente na placa de poliestireno previamente sensibilizada com rSeM, e incubado a temperatura ambiente durante a noite. Após, acrescentou-se anti-IgA de cavalo conjugado a peroxidase (Bethyl laboratories, USA), na diluição 1:2000 por 2h a 37°C. A leitura da densidade ótica foi feita a 450nm em leitor de ELISA MR 700 (Dynatech Labs. Inc. Chantilly, VA, USA), 15min após adição de solução reveladora. O mesmo critério para a determinação do título de Igs em camundongos foi utilizado em cavalos.

2.9 Análise estatística

Para determinar as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias aritméticas foi utilizado o teste T Student.

3. Resultados

3.1 Clonagem, expressão e caracterização das proteínas recombinantes

A seqüência de 1600pb correspondente a região codificadora do gene da proteína M foi amplificada por PCR e visualizada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% (Fig. 1).

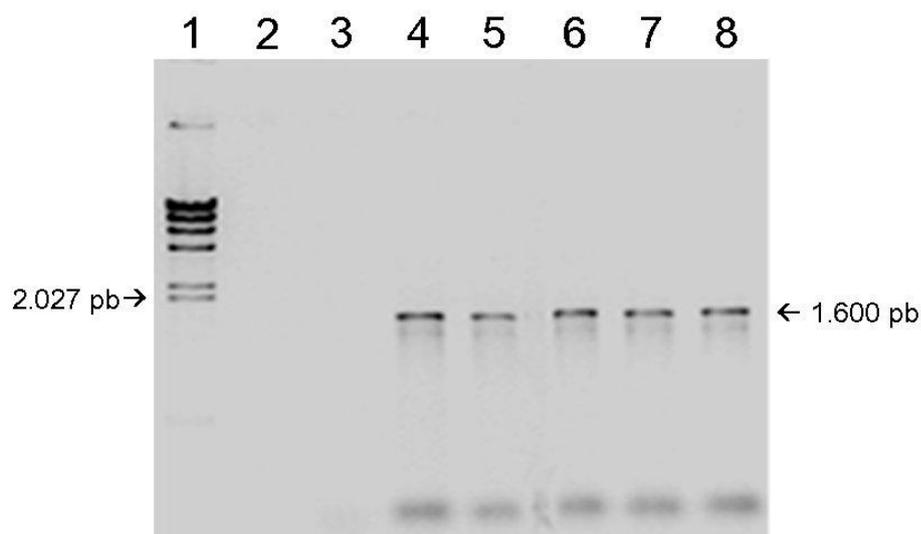


Figura1 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% demonstrando a amplificação do *SeM*. 1- marcador λ HindIII; 4-8- região codificadora do gene *SeM* amplificada.

A Fig. 2 mostra o resultado da triagem das colônias recombinantes após o processo de clonagem, onde foi possível observar em gel de agarose 0,8% a diferença de tamanho entre os plasmídeos recombinantes e não recombinantes. Obteve-se 3 clones recombinantes.

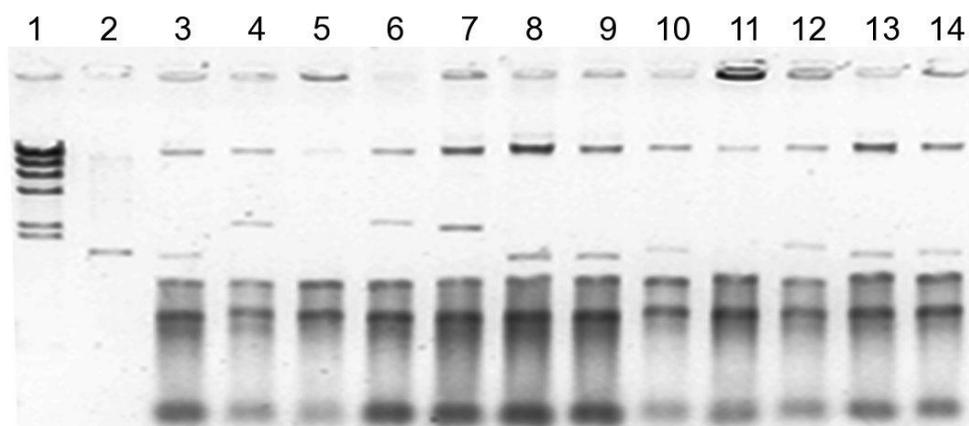


Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% para seleção dos clones recombinantes. 1- marcador λ HindIII; 2- pAE (controle); 4, 6 e 7- clones recombinantes; 3, 5, 8-14- clones não recombinantes.

Após a seleção dos clones recombinantes, estes foram testados para verificar a expressão da proteína de interesse. A Fig. 3 mostra a expressão da proteína recombinante por apenas um dos clones selecionados.

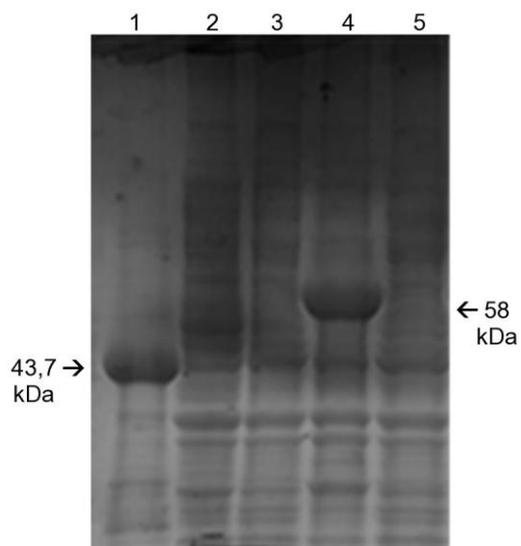


Figura 3 - SDS-PAGE 12% para análise da expressão em pequena escala dos clones recombinantes. 1- Controle positivo (Toxina α de *Clostridium perfringens*); 2- Cultivo de Star (Controle); 3-5- Teste de expressão dos clones recombinantes.

As proteínas rSeM de 58 kDa (Fig. 4) e rLTB de 14 kDa (CONCEIÇÃO et al., 2003) foram reconhecidas pelo MAb anti-6xHis na análise de *Western blot*.

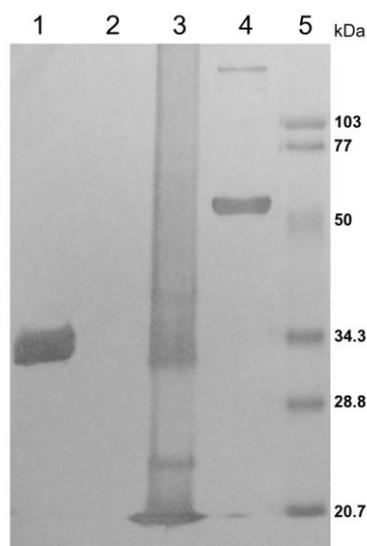


Figura 4 - *Western blot* com MAb anti-6xhis para caracterização das proteínas recombinantes. 1- Controle positivo (LipL32); 2- Extrato de *E. coli* BL21 DE3 Star (controle); 3- rLTB; 4- rSeM; 5- Marcador de massa molecular.

3.2 Teste para a conservação da rSeM

No processo de armazenamento da rSeM, observou-se que esta sofre degradação sendo armazenada sob congelamento. Buscando minimizar este problema separou-se alíquotas de rSeM que foram armazenadas sob diferentes condições (Fig. 5). Para continuação do trabalho optou-se por adotar o método de liofilização da proteína, embora as condições rSeM e PMSF congelada; rSeM, PMSF e glicerol congelada também tenham sido eficientes para conservar a proteína.

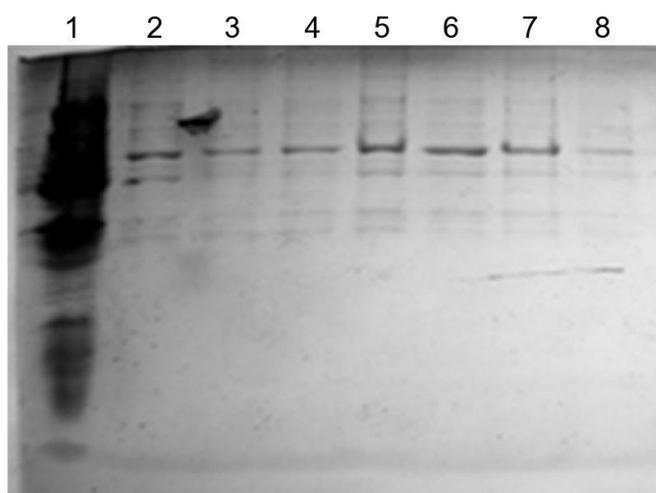


Figura 5 - SDS-PAGE 12% para análise da conservação da rSeM. 1- Extrato de *E. coli* BL21 DE3 Star (controle); 2- rSeM e PMSF 4°C; 3- rSeM congelada; 4- rSeM e glicerol a 4°C; 5- rSeM e PMSF congelada; 6- rSeM, PMSF e glicerol congelada; 7- rSeM liofilizada; 8- rSeM 4°C.

3.3 Resposta imune humoral em camundongos

Os níveis de anticorpos de camundongos inoculados por via intramuscular com diferentes tratamentos contendo rSeM são apresentados na Fig. 6. Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de Igs séricas anti-rSeM induzidos pelos tratamentos em relação ao grupo controle (rLTB + Al(OH)₃), entretanto, entre os demais grupos não houve diferença estatística significativa. Observa-se ainda que uma dose das vacinas contendo rSeM foi capaz de gerar elevados níveis de anticorpos anti-rSeM, mostrando que este antígeno apresenta boa imunogenicidade. Não houve efeito “boost” com as doses posteriores, uma vez que os níveis de anticorpos não aumentaram de forma significativa no decorrer do tempo.

Interessantemente, a rSeM por si só estimulou elevados níveis de Igs totais anti-rSeM.

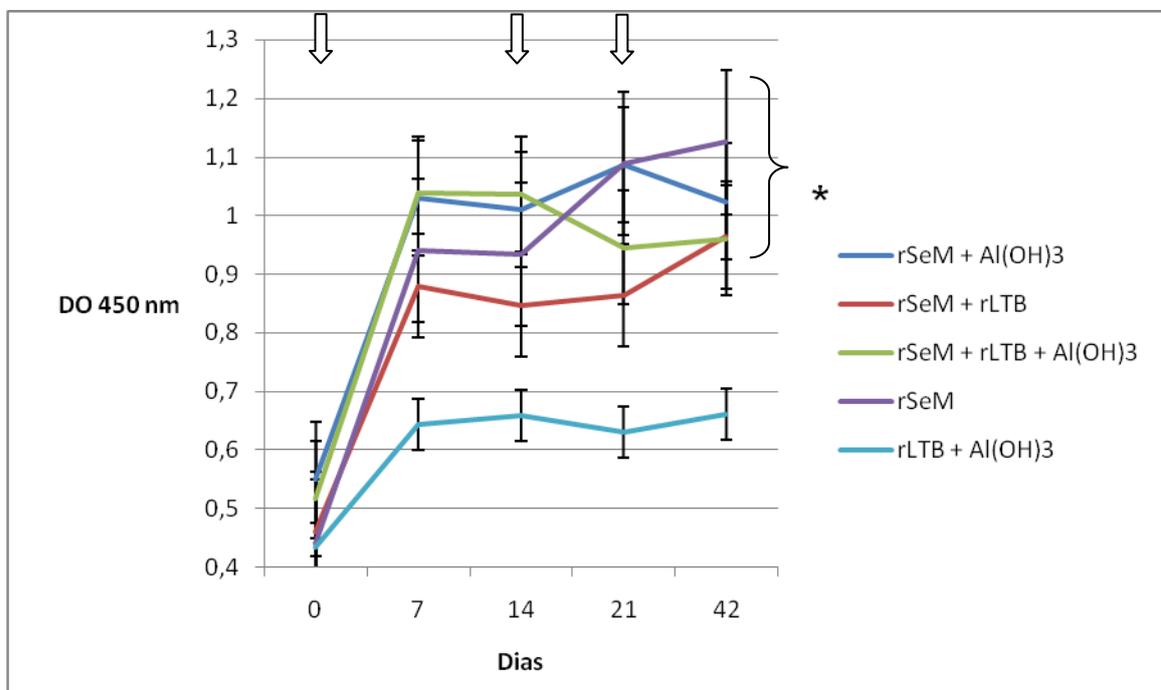


Figura 6 - Cinética dos níveis médios de imunoglobulinas totais séricas anti-rSeM de camundongos inoculados por via intramuscular com diferentes tratamentos contendo rSeM. As setas presentes no gráfico indicam os dias de imunização.* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (rLTB + Al(OH)₃).

O título médio de Igs totais séricas anti-rSeM no dia 42 é mostrado na Fig. 7. Todos os tratamentos contendo rSeM induziram elevados títulos de Igs totais anti-rSeM ($p < 0,05$ em relação ao grupo controle). O grupo rSeM + rLTB apresentou o maior título médio de Igs totais anti-rSeM, porém a diferença com os demais grupos também imunizados com rSeM não foi significativa.

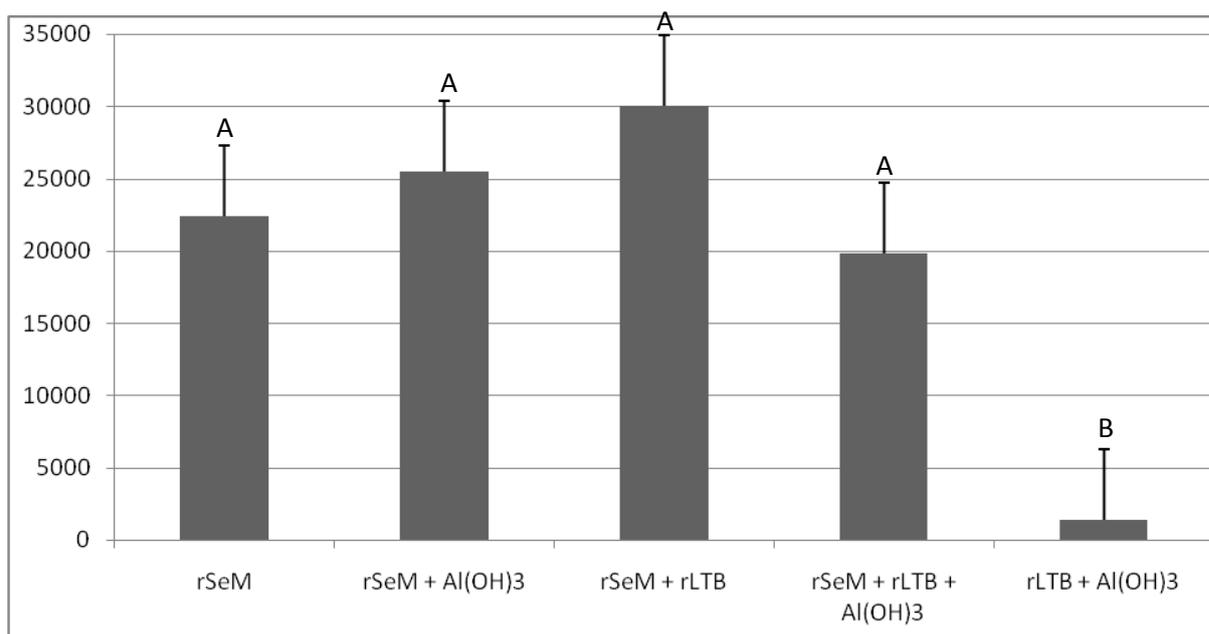


Figura 7 - Título médio de Igs totais séricas anti-rSeM de camundongos inoculados por via intramuscular com diferentes vacinas contendo rSeM. Letras diferentes $p < 0,05$.

Os tratamentos contendo rSeM aplicados nos camundongos por via intranasal (Fig. 8) mostraram que foi necessário três doses de vacina para induzir níveis significativos de anticorpos, embora pode-se observar que o tratamento rSeM foi capaz de aumentar o nível de anticorpos já com duas doses. O aumento gerado por rSeM foi significativo em relação ao controle rLTB ($p < 0,05$).

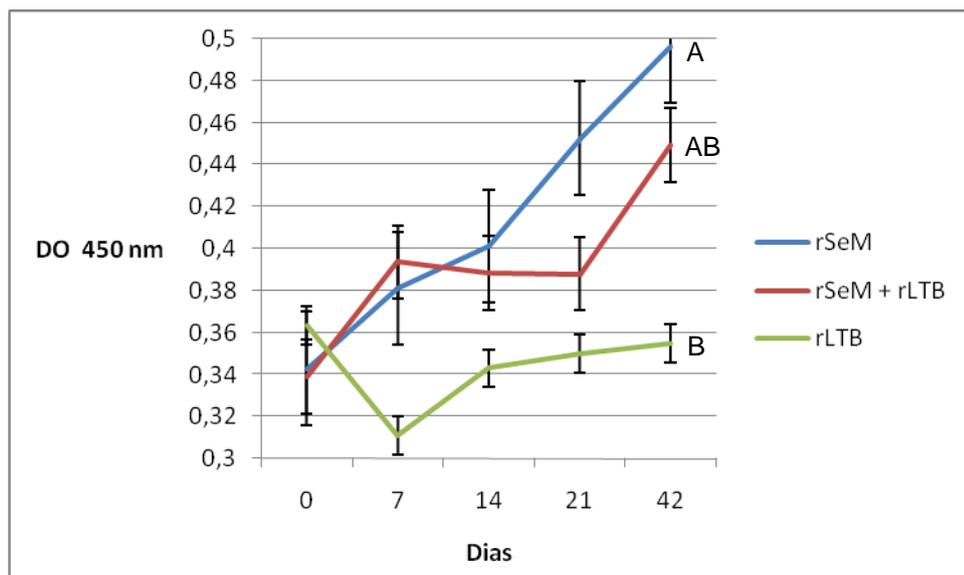


Figura 8 - Cinética dos níveis médios de imunoglobulinas totais séricas anti-rSeM de camundongos inoculados por via intranasal com diferentes vacinas contendo rSeM. As setas no gráfico indicam os dias de vacinação. Letras diferentes $p < 0,05$.

A titulação de anticorpos anti-rSeM de camundongos inoculados por via intranasal é apresentada na Figura 9. Novamente, a rSeM mostrou-se imunogênica por via intranasal mesmo sem adição de adjuvante e da mesma forma que os resultados obtidos por via intramuscular, a rLTB não incrementou de forma significativa o título de anticorpos.

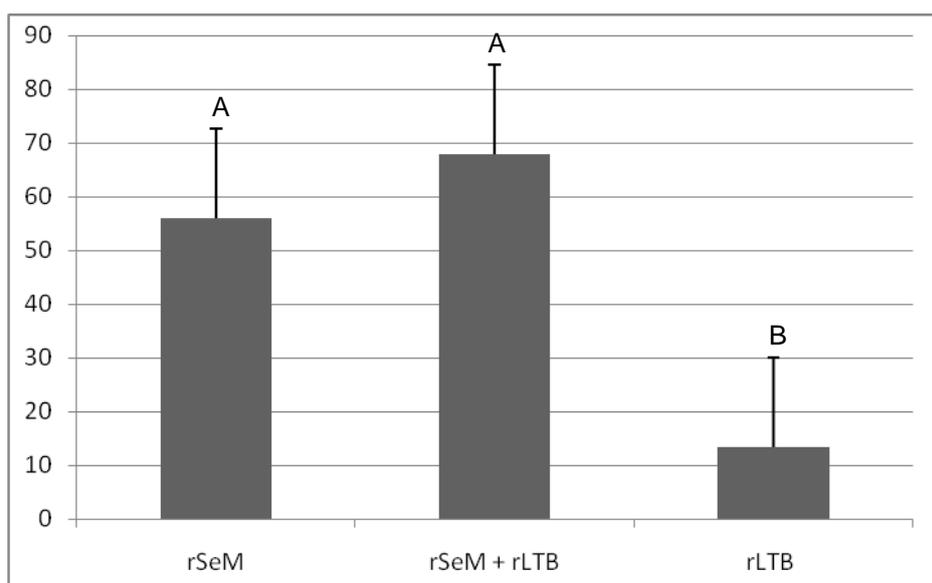


Figura 9 - Título médio de Igs totais séricas anti-rSeM de camundongos inoculados por via intranasal com diferentes vacinas contendo rSeM. Letras diferentes $p < 0,05$.

3.4 Resposta imune humoral em cavalos

O título médio de IgG sérica anti-rSeM em cavalos é apresentado na Fig. 10. Nota-se que no grupo imunizado com rSeM + rLTB (IM) o título sérico de IgG foi incrementado significativamente ($p < 0,05$) comparando o período pré e pós-imunização. Apesar das outras vacinas também terem aumentado o título de IgG sérica anti-rSeM, este não foi significativo. No entanto, estes resultados são animadores, uma vez que vários animais pertencentes a estes grupos, no mínimo duplicaram os títulos de IgG sérica anti-rSeM quando comparado ao título pré-imunização. Houve cavalos que incrementaram 4,8 vezes o título de IgG sérica anti-rSeM.

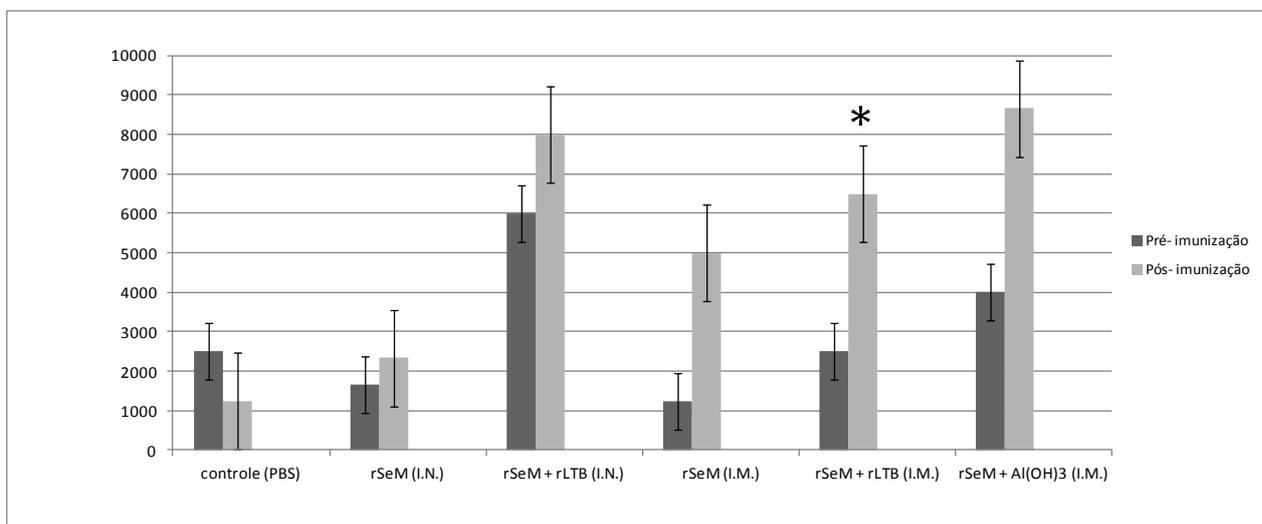


Figura 10 - Título médio de IgG sérica anti-rSeM de cavalos inoculados com diferentes vacinas contendo rSeM.* $p < 0,05$ comparando pré e pós imunização.

Além da avaliação do título médio de IgG sérica, avaliou-se também os níveis de IgA secretora anti-rSeM no trato respiratório superior dos animais inoculados com os diferentes tratamentos (Fig. 11). O grupo imunizado com rSeM + Al(OH)₃ (IM) incrementou significativamente ($p < 0,05$) o nível de IgA secretora anti-rSeM no trato respiratório superior. Os demais tratamentos não foram capazes de incrementar os níveis de IgA. IgA secretora anti-rSeM não foram detectadas nas amostras de saliva (dados não mostrados).

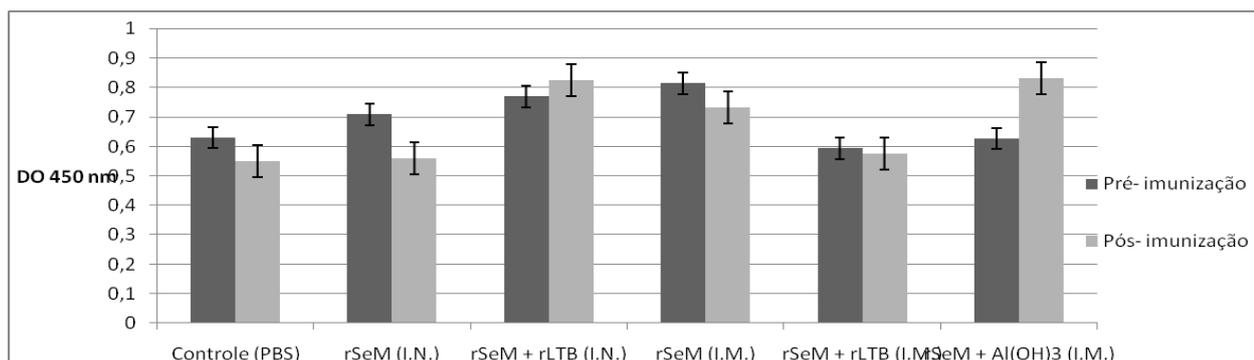


Figura 11 - Níveis médios de IgA secretora anti-rSeM no trato respiratório superior de cavalos inoculados com diferentes vacinas contendo rSeM. * $p < 0,05$ comparando pré e pós imunização.

4. Discussão

A Adenite Equina é uma das enfermidades mais relevantes dentre aquelas que acometem o trato respiratório superior dos equinos e, com isso, a busca por vacinas mais eficientes é de extrema importância. Neste trabalho, avaliou-se o potencial de uma vacina recombinante contra a Adenite Equina utilizando como antígeno vacinal a proteína M de *Streptococcus equi* subsp. *equi* co-administrada com a subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*, ambas produzidas em sistema de expressão heterólogo (*E. coli*). A vacina composta por rSeM co-administrada com rLTB mostrou-se inócua para camundongos e cavalos e foi capaz de gerar um elevado título de Igs séricas anti-rSeM em ambas espécies.

Para avaliação da resposta imune foi utilizado apenas a SeM recombinante como antígeno, pois esta demonstrou resultados satisfatórios quando utilizada em diagnóstico por ELISA, reagindo com o soro de animais doentes, convalescentes e vacinados com bacterina, o que demonstrou que os anticorpos estimulados pela SeM nativa foram capazes de reconhecer a rSeM, com 100% de sensibilidade e especificidade (MORAES, 2008). Este mesmo autor demonstrou ainda que a rSeM foi capaz de proteger camundongos em desafio letal com cepa virulenta de *S. equi*.

Os resultados obtidos no experimento com camundongos mostraram que os tratamentos contendo rSeM promoveram um aumento no nível de imunoglobulinas totais séricas anti-rSeM, tanto por via IM como por via IN, e que mesmo sem adição de adjuvante, a rSeM foi capaz de elevar os níveis de anticorpos, sugerindo que esta versão da SeM é altamente imunogênica, corroborando com os resultados já demonstrados por Moraes (2008).

Na avaliação da resposta imune em cavalos, a rLTB incrementou de forma significativa o título sérico de IgG anti-rSeM pós-imunização no grupo vacinado com rSeM + rLTB (IM), o que torna estes resultados encorajadores. No entanto, esse comportamento não foi observado nos demais tratamentos utilizados. Apesar de a rSeM ser fortemente imunogênica, alguns autores demonstraram resultados promissores em camundongos, porém, não conseguiram níveis significativos de proteção quando testada em cavalos, apesar de gerar anticorpos reativos anti-SeM (MEEHAN, et al. 1998; SHEORAN; ARTIUSHIN, 2002). Buscando vacinas mais eficazes, alguns estudos têm avaliado a utilização de outras proteínas de superfície usadas em combinação. Waller et al. (2007) conseguiram proteger parcialmente pôneis com uma vacina composta por partes dos antígenos recombinantes EAG, CNE and ScIC. Flock et al. (2004) avaliaram uma vacina recombinante composta por FNZ, SFS e EAG, obtendo bons resultados de IgA e IgG. Em 2006, os mesmos autores avaliaram três novos antígenos, ScIC, CNE e FNEB, demonstrando que a vacinação com CNE e ScIC protegeu, enquanto que com FNEB não houve proteção. Eles também estudaram o efeito sinérgico de EAG, que em resultados anteriores mostrou-se eficiente, e obtiveram resultados promissores quando co-administrada com CNE. Florindo et al. (2009) testaram a resposta imune desenvolvida com nanoesferas adsorvidas ou encapsuladas com uma mistura de proteínas extraídas da parede bacteriana de *S. equi* e obtiveram bons resultados, sugerindo não ser necessária a utilização de outros adjuvantes para alcançar uma resposta imune equilibrada. A ativação eficiente do sistema imune de mucosa é de extrema importância para combater patógenos que invadem o hospedeiro por esta via, com isso a necessidade de melhorar a eficácia das vacinas existentes é suplementada pela utilização de substâncias adjuvantes que sejam capazes de estimular resposta nesta porta de entrada. Tem recebido destaque a subunidade B da enterotoxina termolábil de *E. coli*, que tem a sua propriedade adjuvante associada a capacidade de se ligar ao gangliosídeo GM1 (DE HAAN et al., 1998). Vários trabalhos demonstraram sua atividade adjuvante uma vez que é capaz de aumentar a resposta imune humoral e celular antígeno-específicas (FINGERUT et al., 2005; ROCHA et al., 2008; FISCHER et al., 2010). Fingerut et al. (2006) demonstraram que a co-administração da LTB com a proteína recombinante Knob, em galinhas, apresentou boa resposta por via oral e transcutânea, porém não quando administrada por via intramuscular. Os resultados aqui obtidos demonstraram que a

rLTB incrementou de forma significativa o título de IgG sérica anti-rSeM no grupo de equinos vacinados com rSeM + rLTB por via intramuscular. Fischer et al. (2010) avaliaram o efeito adjuvante da rLTB por diferentes via parenterais (IM e SC) e demonstraram que em camundongos a via intramuscular foi mais eficiente. O fato da rLTB não ter aumentado de forma significativa o título de anticorpos nos demais tratamentos em cavalos pode estar relacionado a utilização de uma dose baixa, ao número de doses e ao número de animais avaliados, porém esses aspectos devem continuar sendo explorados em estudos futuros, buscando resultados mais consistentes.

A IgA secretora é o isotipo de imunoglobulina predominante em mucosas e desempenha um papel na defesa contra infecções bacterianas e virais bloqueando a entrada do patógeno ou modulando respostas pró-inflamatórias (RODRIGUEZ et al., 2005). A avaliação dos níveis de IgA secretora em material coletado do trato respiratório superior de cavalos mostrou um aumento significativo apenas no grupo imunizado com rSeM + Al(OH)₃ por via IM. O Al(OH)₃ forma um depósito de antígeno no local da inoculação e de onde é liberado lentamente aumentando o tempo de duração do antígeno com o sistema imune e é amplamente empregado em vacinas por via parenteral. A geração de anticorpos de mucosa por vacinação parenteral é muito difícil devido à distinção anatômica e funcional dos sistemas imunitários de mucosa e sistêmico, resultante da compartimentalização da resposta imune (PETROVSKY; AGUILAR, 2004; KAUFMAN, et al., 2008). Apesar dos dados obtidos demonstrarem aumento de IgA secretora na inoculação via intramuscular, futuros estudos deverão ser realizados para uma melhor compreensão destes resultados.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram viabilidade do uso da rSeM como antígeno vacinal e da rLTB como adjuvante imunológico. Porém mais estudos devem ser realizados, em relação a concentração da dose do antígeno e número de doses, assim como avaliação da capacidade destas vacinas de proteger animais a campo.

5. Referências Bibliográficas

AINSWORTH, D.M.; BILLER, D.S. Sistema Respiratório. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. **Medicina Interna Equina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p.229-230, 2000.

ANDREI, E. **Compêndio Veterinário - Dicionário Brasileiro de Medicamentos Veterinários**. 32^o ed. São Paulo: Andrei, 2002, p.699.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v.7, n.72, p.248-254, 1976.

BRUM, C.; DA HORA, V.P.; MOREIRA, A. N.; CONCEIÇÃO, F.R.; ALEIXO, J. A.G.; DELLAGOSTIN, O. A. Avaliação da Resposta Imune Conferida Pela Proteína Sm14 de *Schistosoma Mansoni* Fusionada ao Adjuvante LTB. In: X Encontro de Pós-Graduação da Universidade Federal de Pelotas, 2008. Pelotas.

CONCEIÇÃO, F.R.; MICHELON, A.; MICHELON, M.; et al. 2003. Clonagem do gene *ltb* de *Escherichia coli*: Produção de um adjuvante recombinante. In: Anais do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2003. Florianópolis.

DA HORA, V. P. ; CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A. ; DOOLAN, D. L. Non-toxic derivatives of LT as potent adjuvants. **Vaccine**, v. 29, p. 1538-1544, 2011.

DE HAAN, L.; VERWEIJ, W. R.; FEIL, I.K.; HOLTROP, M.; HOL, W.G.J.; AGSTERIBBE, E.; WILSCHUT, J. Role of GM1 binding in the mucosal immunogenicity and adjuvant activity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit. **Immunology**, v.94, p.424-430, 1998.

ESALQ. **Estudo do complexo do agronegócio cavalo**. Brasília: Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 68p. (Coletânea de Estudos Gleba, 40). 2006.

FINGERUT, E.; GUTTER, R.; MEIR, D.; ELIAHOO, J.; PITCOVSKI, J. Vaccine and adjuvant activity of recombinant subunit B of *E. coli* enterotoxin produced in yeast. **Vaccine**, v.23, p. 4685-4696, 2005.

FINGERUT, E.; GUTTER, B.; GOLDWAY, M.; ELIAHOO, D.; PITCOVSKI, J. B. subunit of *E. coli* enterotoxin as adjuvant and carrier in oral and skin vaccination **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.112, p.253–263, 2006.

FISCHER, G.; CONCEICAO, F.R.; LEITE, F.P.L.; MORAES, C.M.; FERREIRA, L.N.; VILELA CO, et al. Recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit humoral adjuvant effect depends on dose and administration route. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.26, n. 3, p.489-95, 2010.

FLOCK, M.; KARLSTRÖN, A.; LANNERGARD, J.; GUSS, B.; FLOCK, J.I. Protective effect of vaccination with recombinant proteins from *Streptococcus equi* subspecies *equi* in a strangles model in the mouse. **Vaccine**, n.24, p.4144-4151, 2006.

FLOCK, M.; JACOBSSON, K.; FRYKBERG, L.; HIRST, T.R.; FRANKLIN, A.; GUSS, B.; FLOCK, J.I. Recombinant *Streptococcus equi* proteins protect mice in challenge experiments and induce immune response in horses. **Infection and Immunity**, v.72, n.6, p. 3228-3236, 2004.

FLORINDO, H.F.; PANDIT, S.; GONÇALVES, L.M.D.; ALPAR, H.O.; ALMEIDA, A.J. New approach on the development of a mucosal vaccine against strangles: Systemic and mucosal immune responses in a mouse model. **Vaccine**, n.27, p. 1230-1241, 2009.

KAUFMAN, D.R.; LIU, J. CARVILLE, A.; MANSFIELD, K.G.; HAVENGA, M.J.E.; JAAP GOUDSMIT, J.; BAROUCH, D.H. Trafficking of Antigen-Specific CD8+ T-Lymphocytes to Mucosal Surfaces Following Intramuscular Vaccination. **J Immunol**, v. 181, n.6, p. 4188–4198, 2008.

MAPA- Ministério da Agricultura pecuária e desenvolvimento, disponível em: www.agricultura.gov.br acesso em: 21/05/2011

MCGHEE, J.R.; MESTECKY J.; DERTZBAUGH M.T.; et al. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. **Vaccine**, n. 10, p.75-88, 1992.

MEEHAN, M.; NOWLAN, P.; OWEN, P. Affinity purification and characterization of a fibrinogen-binding protein complex which protects mice against lethal challenge with *Streptococcus equi* subsp. *equi*. **Microbiology**, n.144, p.993-1003, 1998.

MORAES, C.M. **Caracterização fenotípica e estimativa da reatividade cruzada de cepas de *Streptococcus equi* isoladas de equinos da região sul do Rio Grande do Sul**. 2005. 51f. Dissertação (Mestrado em Veterinária)- Curso de Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

MORAES, C.M. **Produção e avaliação de proteína SeM recombinante para o controle de Adenite Equina**. 79f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)- Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, 2008.

MOARES, C.M.; VARGAS, A.P.C.; LEITE, F.P.L.; NOGUEIRA, C.E.W.; TURNES, C.G. Adenite Equina: sua etiologia, diagnóstico e controle. **Ciência Rural** [da Universidade Federal de Santa Maria], v.9, n.6. 2009.

ROCHA, A.S.R.; CONCEIÇÃO, F.R.; GRASSMANN, A.A.; LAGRANHA, V.L.; DELLAGOSTIN, O.A. B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as adjuvant of humoral immune response in recombinant BCG vaccination. **Canadian Journal of Microbiology**, v.54, n.8, p.677-686, 2008.

RODRIGUEZ, A.; TJÄRNLUND, A.; IVANJI, J.; SINGH, M.; GARCIA, I.; WILLIAMS, A.; MARSH, P.D.; TROYE-BLOMBERG, M.; FERNÁNDEZ, C. Role of IgA in the defense against respiratory infections IgA deficient mice exhibited increased susceptibility to intranasal infection with *Mycobacterium bovis* BCG. **Vaccine**, v.23, p. 2565-2572, 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SHEORAN, A.S.; SPONSELLER, B.T.; HOLMES, M A.; TIMONEY, J.F. Serum and mucosal antibody isotype responses to M-like protein (SeM) of *Streptococcus equi* in convalescent and vaccinated horses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n.59, p.239-251, 1997.

SHEORAN A.S.; ARTIUSHIN J.F.; TIMONEY J.F. Nasal mucosal immunogenicity for the horse of SeM peptide of *Streptococcus equi* genetically coupled to cholera toxin. **Vaccine**, n.20, p.1653-1659, 2002.

TIMONEY, J.F. The pathogenic equine streptococci. **Veterinary Research**, v.35, p.397-409, 2004.

4. CONCLUSÕES

- A rSeM foi inócua e imunogênica para cavalos e camundongos;
- A rSeM induziu por si só elevados títulos de Igs totais anti-rSeM em camundongos imunizados por via intramuscular;
- A rLTB incrementou significativamente o título de IgG sérica anti-rSeM em cavalos imunizados por via intramuscular;
- O adjuvante $Al(OH)_3$ aumentou o nível de IgA secretora anti-rSeM no trato respiratório superior de cavalos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINSWORTH, D. M.; BILLER, D. S. Sistema Respiratório. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. **Medicina Interna Equina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p. 229-230, 2000.

ANDREI, E. **Compêndio Veterinário - Dicionário Brasileiro de Medicamentos Veterinários**. 32^o ed. São Paulo: Andrei, 2002, p. 699.

ALOUF, J. Streptococcal toxins (streptolysin O, streptolysin S, erythrogenic toxin). **Pharmacology and Therapeutics**, n. 11, p. 661-717, 1980.

ARTIUSHIN, S. C.; TIMONEY, J. F.; SHEORAN, A. S.; MUTHUPALANI, S. K. Characterization and immunogenicity of pyrogenic mitogens SePE-H and SePE-I of *Streptococcus equi*. **Microbial Pathogenesis**, n.32, p.71-85, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v.7, n.72, p.248-254, 1976.

BRUM, C.; DA HORA, V. P.; MOREIRA, A. N.; CONCEIÇÃO, F. R.; ALEIXO, J. A. G.; DELLAGOSTIN, O. A. Avaliação da Resposta Imune Conferida Pela Proteína Sm14 de *Schistosoma Mansoni* Fusionada ao Adjuvante LTb. In: X Encontro de Pós-Graduação da Universidade Federal de Pelotas, 2008. Pelotas.

CARR, A.; SLEDJESKI, D. D.; PODBIELSKI, A.; BOYLE, M. D. P.; KREIKEMEYER, B. Similarities between complement-mediated and streptolysin S-mediated hemolysis. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.45, p.41790-41796, 2001.

CHANTER, N. Streptococci and enterococci as animal pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, n.83, p.1005-1095, 1997.

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**, n.24, p.5734-5743, 2006.

CONCEIÇÃO, F. R.; MICHELON, A.; MICHELON, M. Clonagem do gene *ltb* de *Escherichia coli*: Produção de um adjuvante recombinante. In: Anais do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2003. Florianópolis.

DA HORA, V. P.; CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A. ; DOOLAN, D. L. Non-toxic derivatives of LT as potent adjuvants. **Vaccine**, v.29, p.1538-1544, 2011.

DE HAAN, L.; VERWEIJ, W. R.; FEIL, I. K.; HOLTROP, M.; HOL, W. G. J.; AGSTERIBBE, E.; WILSCHUT, J. Role of GM1 binding in the mucosal immunogenicity and adjuvant activity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit. **Immunology**, v.94, p.424-430, 1998.

DUARTE, R. S.; MIRANDA, O. P.; BELLEI, B. C.; BRITO, M. A. V. P.; TEIXEIRA, L. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.9, p.4214-4222, 2004.

ERICKSON, E. D.; NORCROSS, N. L. The cell surface antigens of *Streptococcus equi*. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, n.39, p.110-115, 1975.

FACKLAM, R. What happened to the Streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes, **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.4, p.613-630, 2002.

FINGERUT, E.; GUTTER, B.; GOLDWAY, M.; ELIAHOO, D.; PITCOVSKI, J. B. Subunit of *E. coli* enterotoxin as adjuvant and carrier in oral and skin vaccination **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.112, p.253–263, 2006.

FINGERUT, E.; GUTTER, B.; MEIR, R.; ELIAHOO, D.; PITCOVSKI, J. Vaccine an adjuvant activity of recombinant subunit B of *E. coli* enterotoxin produced in yeast. **Vaccine**, n.23, p.4685-4696, 2005.

FISCHER, G.; CONCEIÇÃO, F. R.; LEITE, F. P. L.; MORAES, C. M.; FERREIRA, L. N.; VILELA, C. O.; CAETANO, C. F.; VARGAS, G. D.; HÜBNER, S. O.; VIDOR, T.; ROEHE, P. M. Recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit humoral adjuvant effect depends on dose and administration. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, n.26, p.489- 495, 2010.

FLANAGAN, J.; COLLIN. N.; TIMONEY.J.; MITCHELL. T.; MUNFORD, J. A.; CHANTER. N. Characterization of the haemolytic activity of *Streptococcus equi*. **Microbial Pathogens**, n.24, p.211-221, 1998.

FLOCK, M.; KARLSTRÖN, A.; LANNERGARD, J.; GUSS, B.; FLOCK, J.I. Protective effect of vaccination with recombinant proteins from *Streptococcus equi* subspecies *equi* in a strangles model in the mouse. **Vaccine**, n.24, p.4144-4151, 2006.

FLOCK, M.; JACOBSON, K.; FRYKBERG, L.; HIRST, T.R. FRANKLIN, A.; GUSS, B.; FLOCK, J.I. Recombinant *Streptococcus equi* proteins protect mice in challenge experiments and induce immune response in horses. **Infection and Immunity**, v.72, n.6, p.3228-3236, 2004.

FLORINDO, H. F.; PANDIT, S.; GONÇALVES, L. M. D.; ALPAR, H. O.; ALMEIDA, A. J. New approach on the development of a mucosal vaccine against strangles: Systemic and mucosal immune responses in a mouse model. **Vaccine**, n.27, p.1230-1241, 2009.

FONTAINE, M. C.; LEE, J. J.; KEHOE, M. A. Combined contributions of streptolysin O and streptolysin S to virulence of serotype M5 *Streptococcus pyogenes* strain Manfredo. **Infection and Immunity**, n.71, p.3857-3865, 2003.

FREY JR., F. Índices epidemiológicos em potros Puro Sangue Inglês, do nascimento ao sexto mês de vida, na região de Bagé-RS. 2006. 46f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

GALÁN, J. E.; TIMONEY, J. F. Molecular analysis of the M protein of *Streptococcus equi* and cloning and expression of the M protein gene in *Escherichia coli*. **Infection and Immunity** v. 55, n.12, p.3181-3187, 1987.

GRANT, S. T.; EFSTRATION, A.; CHANTER, N. Laboratory diagnosis of strangles and the isolation of atypical *Streptococcus equi*. **Veterinary Record**, v.133, p.215-216, 1993.

GUNTHER, E.; OZEGOWSKI, J. H.; KOHLER, W. Occurrence of extracellular hyaluronic acid and hyaluronate lyase in streptococci of groups A, B, C, and G. **Zentralblatt fur Bakteriologie**, v.285, p.64-73, 1996.

GUSS, B.; FLOCK, M.; FRYKBERG, L.; WALLER, A. S.; ROBINSON, C.; SMITH, K. C. FLOCK, J. I. Getting to Grips with Strangles: An Effective Multi-Component Recombinant Vaccine for the Protection of Horses from *Streptococcus equi* Infection. **PLoS Pathogens**, v.5, n.9, 2009.

HARRINGTON, D. J.; SUTCLIFFE, I. C; CHANTER, N. The molecular basis of *Streptococcus equi* infection and disease. **Microbes and Infection**, n.4, p.501-510, 2002.

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2003. 446p.

HYNES, W. L.; HANCOCK, L.; FERRETTI, J. J. Analysis of a second bacteriophage hyaluronidase gene from *Streptococcus pyogenes*: evidence for a third hyaluronidase involved in extracellular enzymatic activity. **Infection and Immunity**, n.63, p.3015-3020, 1995.

HYNES, W. L.; WALTON, S. L. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, n.183, p.201-207, 2000.

HOLDEN, M. T.; HEATHER, Z.; PAILLOT, R.; STEWARD, K.F.; WEBB, K.; AINSLIE, F.; JOURDAN, T.; BASON, N.C.; HOLROYD, N.E.; MUNGALL, K.; QUAIL, M.A.; SANDERS, M.; SIMMONDS, M.; WILLEY, D.; BROOKS, K.; AANENSEN, D.M.; SPRATT B.G.; JOLLEY K.A.; MAIDEN M.C.; KEHOE M.; CHANTER N.; BENTLEY, S. D.; ROBINSON, C.; MASKELL, D.J.; PARKHILL, J.; WALLER, A. S. Genomic Evidence for the Evolution of *Streptococcus equi*: Host Restriction, Increased Virulence, and Genetic Exchange with Human Pathogens. **PLoS Pathogens**, v.5, n.3, 2009.

HULTING, G.; FLOCK, M.; FRYKBERG, L.; LANNERGARD, J.; FLOCK, J. I.; GUSS, B. Two novel IgG endopeptidases of *Streptococcus equi*. **FEMS Microbiology Letter**, n.298, p.44-50, 2009.

IVENS, P. A.; MATTHEWS, D.; WEBB, K.; NEWTON, J. R.; STEWARD, K.; WALLER, A. S.; ROBINSON, C.; SLATER, J. D. Molecular characterisation of 'strangles' outbreaks in the UK: the use of M protein typing of *Streptococcus equi* ssp. *equi*. **Equine Veterinary Journal**, n.43, p.359–364, 2011.

KARLSTRÖM, A.; JACOBSSON, K.; GUSS, B. ScIC is a member of a novel family of collagen-like proteins in *Streptococcus equi* subspecies *equi* that are recognised by antibodies against ScIC. **Veterinary Microbiology**, n.114, p.72-81, 2006.

KAUFMAN, D.R.; LIU, J. CARVILLE, A.; MANSFIELD, K.G.; HAVENGA, M.J.E.; JAAP GOUDSMIT, J.; BAROUCH. D.H. Trafficking of Antigen-Specific CD8+ T-Lymphocytes to Mucosal Surfaces Following Intramuscular Vaccination. **Journal of Immunology**, v.181, n.6, p.4188-4198, 2008.

KAWATA, K.; ANZAI, T.; SENNA, K.; KIKUNCHI, N.; EZAWA, A.; TAKAHASHI, T. Simple and rapid PCR method for identification of streptococcal species relevant to animal infections based on 23S rDNA sequence. **FEMS Microbiology Letters**, n.237, p.57-64, 2004.

KELLY, C.; BUGG, M.; ROBINSON, C.; MITCHELL, Z.; DAVIS-POYNTER, N.; NEWTON, J. R.; JOLLEY, K. A.; MAIDEN, M. C.; WALLER, A. S. Sequence variation of the SeM gene of *Streptococcus equi* allows discrimination of the source of strangles outbreaks. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.480-486, 2006.

KEMP-SYMONDS J.; KEMBLE, T.; WALLER, A. Modified live *Streptococcus equi* ('strangles') vaccination followed by clinically adverse reactions associated with bacterial replication. **Equine Veterinary Journal**, n.39, p.284-286, 2007.

KUWAMOTO, Y.; ANZAY, T.; WADA, R. Microplate sugar-fermentation assay distinguishes *Streptococcus equi* from other streptococci of Lancefield's group C. **Equine Veterinary Science**, v.12, n.2, p.47-49, 2001.

LANNERGARD, J.; FRYKBERG, L; GUSS, B. CNE, a collagen-binding protein of *Streptococcus equi*. **FEMS Microbiology Letters**, n. 222, p.69-74, 2003.

LANNERGARD, J.; FLOCK, M.; JOHANSSON, S.; FLOCK, J. I.; GUSS, B. Studies of Fibronectin-Binding Proteins of *Streptococcus equi*. **Infection and Immunity**, v.73, n.11, p. 7243–7251, 2005.

LANNERGARD, J.; GUSS, B. IdeE, an IgG-endopeptidase of *Streptococcus equi* ssp. *equi*. **FEMS Microbiology Letters**, n.262, p.230-235, 2006.

LEWIS, M.; MEEHAN, M.; OWEN, P.; WOOF, J. M. A Common Theme in Interaction of Bacterial Immunoglobulin-binding Proteins with Immunoglobulins Illustrated in the Equine System. **Journal of Biological Chemistry**, v.283, n.25, 2008.

LI S.; KELLY, S. J.; LAMANI, E.; FERRARONI, M.; JEDRZEJAS, M. J. Structural basis of hyaluronan degradation by *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase. **EMBO Journal**, n.19, p.1228-1240, 2000.

LINDMARK, H.; GUSS, B. SFS, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus equi*, inhibits the binding between fibronectin and collagen. **Infection and Immunity**, v.67, n.5, p.2383-2388, 1999.

LINDMARK, H.; NILSSON, M.; GUSS, B. Comparison of fibronectin-binding protein FNE from *Streptococcus equi* with FNZ from *S. equi* subspecies *zooepidemicus*, reveals a major and conserved difference. **Infection and Immunity**, v.69, n.5, p.3159-3163, 2001.

LIU, N.; GAO, F.; HAN, Z.; XU, X.; UNDERHILL, C.B.; ZHANG, L. Hyaluronan Synthase 3 Overexpression Promotes the Growth of TSU Prostate Cancer Cells. **Cancer Research**, n.61, p.5207-5214, 2001.

MAPA - Ministério da Agricultura pecuária e desenvolvimento, disponível em: <www.agricultura.gov.br> acesso em: 21 maio 2011.

MCGHEE, J. R.; MESTECKY J.; DERTZBAUGH M. T. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. **Vaccine**, n.10, p.75-88, 1992.

MEEHAN, M.; NOWLAN, P.; OWEN, P. Affinity purification and characterization of a fibrinogen-binding protein complex which protects mice against lethal challenge with *Streptococcus equi* subsp. *equi*. **Microbiology**, n.144, p.993-1003, 1998.

MEEHAN, M. D.; MULDOWNNEY, A.; WATKINS, N. J.; OWEN, P. Localization and characterization of the ligand-binding domain of the fibrinogen-binding protein (FgBP) of *Streptococcus equi* subsp. *equi*. **Microbiology**, n.146, p.1187-1194, 2000.

MEEHAN, M.; KELLY, S. M.; PRICE, N. C.; OWEN, P. The C terminal portion of the fibrinogen-binding protein of *Streptococcus equi* subsp. *equi* contains extensive α -helical coiled-coil structure and contributes to thermal stability. **FEMS Microbiology**, n.206, p.81-86, 2002.

MOORE, B. O.; BRYANS, J. T. Type specific antigenicity of group C streptococci from disease of the horse. In: **Proceedings of the Second International Conference on Equine Infectious diseases**, S. Karger: Basel, 1970, p.231-238.

MOARES, C. M.; VARGAS, A. P. C.; LEITE, F. P. L.; NOGUEIRA, C. E. W.; TURNES, C. G. Adenite Equina: sua etiologia, diagnóstico e controle. **Ciência Rural**, v.9, n.6. 2009.

MORAES, C. M.; ROCHA, A. S. R.; DUMMER, L. A.; SANTOS JUNIOR, A. G.; NOGUEIRA, C. E. W.; VARGAS, A. P. C.; LEITE, F. P. L.; CONCEIÇÃO, F. R.; GIL-TURNES, C. Recombinant protein M detects antibodies induced by *Streptococcus equi* strains isolated from cases of strangles. In: INTERNATIONAL VETERINARY IMMUNOLOGY SYMPOSIUM, 2007, Ouro Preto, MG. **Anais do 8° Simpósio Internacional de Imunologia**. Ouro Preto: Brazilian Society for immunology, 2007. 162p.

MORAES, C. M. **Caracterização fenotípica e estimativa da reatividade cruzada de cepas de *Streptococcus equi* isoladas de eqüinos da região sul do Rio Grande do Sul**. 2005. 51f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Curso de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

MORAES, C. M. **Produção e avaliação de proteína SeM recombinante para o controle de Adenite Eqüina**. 2008. 79f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

NALLY, J. E.; ARTIUSHIN, S.; SHEORAN, A. S.; BERNS, P. J.; SIMON, B.; GILLEY, R. M.; GIBSON, J.; SULIVAN, S.; TIMONEY, J. F. Induction of mucosal and systemic antibody specific for SeMF3 of *Streptococcus equi* by isobutirate based delivery system. **Vaccine**, n.19, p.492-497, 2001.

NORRBY-TEGLUND, A.; NORGREN, M.; HOLM, S. E.; ANDERSSON, U.; ANDERSSON, J. Similar cytokine induction profiles of a novel streptococcal exotoxin, MF, and pyrogenic exotoxins A and B. **Infection and Immunity**, n.62, p.3731-3738, 1994.

PAILLOT, R.; ROBINSON, C.; STEWARD, K.; WRIGHT, N.; JOURDAN, T.; BUTCHER, N.; HEATHER, Z.; WALLER, A. S. Contribution of Each of Four Superantigens to *Streptococcus equi*-Induced Mitogenicity, Gamma Interferon Synthesis, and Immunity. **Infection and Immunity**, v.78, n.4, p.1728-1739, 2010.

ROCHA, A. S. R.; CONCEIÇÃO, F. R.; GRASSMANN, A. A.; LAGRANHA, V. L.; DELLAGOSTIN, O. A. B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as adjuvant of humoral immune response in recombinant BCG vaccination. **Canadian Journal of Microbiology**, v.54, n.8, p.677-686, 2008.

RODRIGUEZ, A.; TJÄRNLUND, A.; IVANJI, J.; SINGH, M.; GARCIA, I.; WILLIAMS, A.; MARSH, P. D.; TROYE-BLOMBERG, M.; FERNÁNDEZ, C. Role of IgA in the defense against respiratory infections IgA deficient mice exhibited increased susceptibility to intranasal infection with *Mycobacterium bovis* BCG. **Vaccine**, v.23, p.2565-2572, 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHILD, A.L. Infecção por *Streptococcus equi*. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C.; LEMOS, R.A.A. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. Varela Editora e Livraria LTDA, São Paulo, 2001, p.265-269.

SHEORAN, A. S.; ARTIUSHIN, J. F.; TIMONEY, J. F. Nasal mucosal immunogenicity for the horse of SeM peptide of *Streptococcus equi* genetically coupled to cholera toxin. **Vaccine**, n.20, p.1653-1659, 2002.

SHEORAN, A. S.; SPONSELLER, B. T.; HOLMES, M. A.; TIMONEY, J. F. Serum and mucosal antibody isotype responses to M-like protein (SeM) of *Streptococcus equi* in convalescent and vaccinated horses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n.59, p.239-251, 1997.

SILVA, M. S.; VARGAS, A. P. C. Adenite Equina: Aspectos clínicos, agente etiológico e métodos de diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.4, p.493-498, 2006.

SILVA, M. S.; COSTA, M. M.; BOTTON, S. A.; BARRETA, C.; GROFF, A. C. M.; VARGAS, A. C. Phenotypical assays and parcial sequencing of the *hsp60* gene for identification of *Streptococcus equi*. **Current Microbiology**, v.54, p.331-334, 2007.

SRISKANDAN, S.; FAULKNER, L.; HOPKINS, P. *Streptococcus pyogenes*: insight into the function of the streptococcal superantigens. **International Journal of Biochemistry Cell Biology**, n.39, p.12-19, 2007.

STERN, R.; JEDRZEJAS, M. J. The Hyaluronidases: Their Genomics, Structures, and Mechanisms of Action. **Chemical Reviews**, v.106, n.3, p.818–839, 2006.

SWEENEY, C. R. *Streptococcus equi*. In: SMITH, B. P. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**. São Paulo: Manole LTDA, 1993, p.531-533.

SWEENEY, C.R.; TIMONEY, J.F.; NEWTON, J.R.; HINES, M.T. *Streptococcus equi* infections in horses: guidelines for treatment, control, and prevention of strangles. **Journal of veterinary internal medicine**. n.19, v.1, p.123- 134, 2005.

TIMONEY, J. F.; ARTIUSHIN, S. C.; BOSCHWITZ, J. S. Comparison of the sequences and functions of *Streptococcus equi* M-like proteins SeM and SzPSe. **Infection and Immunity**, n.65, p.3600-3605, 1997.

TIMONEY, J. F.; YANG, J.; LIU, J.; MERANT, C. IdeE reduce the bactericidal activity of equine neutrophils for *Streptococcus equi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n.122, p.76-82, 2008.

TIMONEY, J. F. The pathogenic equine streptococci. **Veterinary Research**, v.35, p.397- 409, 2004.

TIWARI, R.; QIN, A.; ARTIUSHIN, S.; TIMONEY, J. F. Se18.9, an anti-phagocytic factor H binding protein of *Streptococcus equi*. **Veterinary Microbiology**, n.121, p.105-115, 2007.

WALLER, A. S.; JOLLEY, K. A. Getting a grip on strangles: recent progress towards improved diagnostics and vaccines. **The Veterinary Journal**, v.173, p.492–501, 2007.

WALLER, A. S.; PAILLOT, R.; TIMONEY, J. F. *Streptococcus equi*: a pathogen restricted to one host. **Journal of Medical Microbiology**, n.60, p.1231-1240, 2011.

WALKER, J. A.; TIMONEY, J. F. Construction of a stable non-mucoid deletion mutant of the *Streptococcus equi* Pinnacle vaccine strain. **Veterinary Microbiology**, n.89, p.311-321, 2002.

WALKER, J. A.; TIMONEY, J. F. Molecular basis of variation in protective SzP proteins of *Streptococcus zooepidemicus*. **American Journal of Veterinary Research**, v.59, p.1129-1133, 1998.

WOOLCOCK, J. B. Purification and antigenicity of a M-like protein of *Streptococcus equi*. **Infection and Immunity**, n.10, p.116-122, 1974.