

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL CONTRA *C. PSEUDOTUBERCULOSIS* PRODUZIDA POR CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM A ASSOCIAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES NanH E PknG COMBINADAS COM DIFERENTES ADJUVANTES

Fernanda Kanaan de Azambuja¹; Rodrigo Albertho Almeida Wedy²; Gustavo dos Santos Hartleben²; Nicole Ramos Scholl², Tallyson Nogueira Barbosa² e Sibe Borsuk³

¹Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPEl – nandakanaan_02@hotmail.com

²Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPEl – wedy.rodrigo@gmail.com

²Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPEl – gustavo-hart@hotmail.com

²Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPEl – nicoleramosscholl@hotmail.com

²Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPEl – tallyson_n_b@hotmail.com

³Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPEl – sibeleborsuk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria Gram-positiva, pleomórfica, intracelular e é o agente etiológico da linfadenite caseosa (LC), doença infecciosa caracterizada pelo surgimento de abscessos nos linfonodos de ovinos e caprinos infectados. Quando em sua forma intracelular, *C. pseudotuberculosis* fica envolta de uma espessa camada de material caseoso, o que torna o tratamento com antibióticos ineficaz, por conta disso, essa enfermidade é responsável por significativas perdas econômicas em países que praticam a ovinocaprinocultura, como o Brasil (GUIMARÃES et al., 2011). Desse modo, a solução mais adequada para combater a LC é a prevenção através de vacinas. Entretanto, atualmente nenhuma vacina no mercado apresenta proteção adequada contra o patógeno (COSTA et al., 2011).

Diferentes estratégias vacinais têm sido testadas nos últimos anos. Um exemplo é o estudo de Silva et al. (2018), onde foram testadas formulações de vacinas recombinantes contendo as proteínas rCP01850 e rCP09720 associadas à rPLD. Os autores descrevem que o grupo de animais vacinados com rPLD + rCP01850 associado ao adjuvante saponina levou a níveis elevados de anticorpos IgG totais e induziu uma resposta do tipo Th1 decorrente do aumento da produção das citocinas TNF- α e IFN- γ . Dessa forma, mais vacinas compostas de subunidade proteica foram desenvolvidas e testadas (PINHO et al., 2021).

Em adição, estudos genômicos foram realizados a fim de encontrar potenciais alvos vacinais e, quando identificados, tiveram a base molecular da virulência e patogenicidade estudada. No tocante, a cepa FRC41 de *C. pseudotuberculosis*, foi submetida a uma análise genômica completa, resultando na identificação de genes que codificam para proteínas NanH (neuraminidase H) e PknG (proteína quinase G) e que apresentam potenciais fatores de virulência.

A proteína NanH está inserida na membrana celular bacteriana, fato que facilita o reconhecimento do antígeno pelas células do sistema imunológico. Portanto, possui maior potencial para alvo vacinal (SANTANA et al., 2016). A proteína PknG, é um importante fator de virulência em *M. tuberculosis* atuando impedindo a fusão fago-lisossomal, assim permitindo com que a bactéria consiga sobreviver e se multiplicar no interior de um fagócito. Sendo assim, a utilização de proteínas rNanH e rPknG se mostra promissor para o desenvolvimento de vacinas contra linfadenite caseosa e a sua associação permitiria um aumento no número de antígenos disponíveis (MOREIRA et al., 2022).

Ademais, a escolha de um adjuvante adequado é fundamental para formulação de uma vacina, pois estes intensificam a resposta imunológica, diminuindo o número de doses necessárias (GUY, 2007). Dentre os adjuvantes amplamente utilizados, o hidróxido de alumínio é conhecido por induzir respostas imunes mistas Th1/Th2. Já as saponinas, ativam linfócitos T citotóxicos, induzem uma resposta Th1 e estimulam a geração de anticorpos (GUY, 2007).

Em vista disso, este estudo tem por objetivo avaliar a resposta imune humoral produzida por camundongos Balb/c, desafiados com a cepa patogênica MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*, imunizados com formulações vacinais compostas pela associação de NanH e PknG recombinantes de *C. pseudotuberculosis*, combinadas com adjuvantes de hidróxido de alumínio ou saponina.

2. METODOLOGIA

Para este estudo, foram utilizados os plasmídeos recombinantes pAE/nanH, previamente construído por nosso grupo de pesquisa, e pD444-NH/pknG, construído e gentilmente cedido pelo Laboratório de Genética Celular e Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais. Os plasmídeos foram introduzidos em *E. coli* BL21 (DE3) Star através de choque térmico. A indução da expressão protéica foi feita com a adição de isopropil α -D-tiogalactosídeo (IPTG). Posteriormente, as culturas foram centrifugadas e as proteínas recombinantes foram purificadas pelo método de cromatografia de afinidade, através de uma coluna de níquel HisTrap™ Sepharose (GE Healthcare) e foi realizada diálise para que houvesse o redobramento da proteína. Para confirmar a identidade das proteínas recombinantes foi realizado western blot.

A imunização e o desafio foram realizados em camundongos Balb/c alocados em 3 grupos de 10 animais, de idade entre 6 e 8 semanas. Os grupos foram representados por: G1 - Solução Salina 0,9% (controle negativo), G2 - rNanH + rPknG + Saponina e G3 rNanH + rPknG + Al(OH)³. Os animais foram imunizados por via subcutânea com duas doses de vacina com 21 dias de intervalo. Foram realizadas coletas de sangue nos dias 0 (antes da imunização), 21 (após a primeira dose) e 42 (após a segunda dose) do experimento. 21 dias após a última imunização os animais foram desafiados com a cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*, injetada via intraperitoneal.

A avaliação da resposta imune humoral foi realizada através de teste de ELISA para identificação de IgG específico. Soros de animais do grupo G1 foram testados contra uma mistura das proteínas rPknG e rNanH enquanto os soros de animais dos grupos G2 e G3 foram testados contra ambos os anticorpos (anti-rNanH e anti-rPknG) separadamente. Para a detecção de IgG total, foi utilizado anticorpo IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich). Já para a detecção de IgG1 e IgG2a, um passo a mais foi realizado, utilizamos anticorpo IgG1 de cabra anti-camundongo ou anticorpo IgG2a de cabra anti-camundongo. A absorbância foi medida a 492 nm utilizando um espectrofotômetro de placas.

Para as análises estatísticas foram realizados teste exato de Fisher e teste log-rank, juntamente de análise de variância unidirecional (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Tukey. Diferenças estatísticas significativas foram caracterizadas por valores de $p < 0,05$. O software GraphPad Prism versão 7 para Windows foi utilizado para todas as análises estatísticas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As proteínas rNanH e rPknG foram expressas na cepa de *E. coli* BL21 (DE3) Star e solubilizadas em uréia 8 M. Através da técnica de Western Blot obteve-se confirmação da identidade das proteínas recombinantes, as bandas reativas apresentaram os valores esperados conforme dados da literatura, de aproximadamente 70 kDa e 80 kDa, para rNanH e rPknG respectivamente.

Para avaliar os níveis de IgG total, IgG1 e IgG2a produzidos, foram realizados testes de ELISA indireto, podendo ser observado nas Figuras 2 e 3. Os resultados apresentam diferença estatística significativa ($p < 0,0001$), apresentando aumento nos níveis de IgG em ambos os grupos no dia 42 quando comparados ao controle negativo. No ELISA anti-rNanH, G3 apresentou aumento na produção de IgG total a partir do dia 21 e G2 apresentou aumento apenas no dia 42, entretanto G2 apresentou melhor produção de IgG1 e IgG2a.

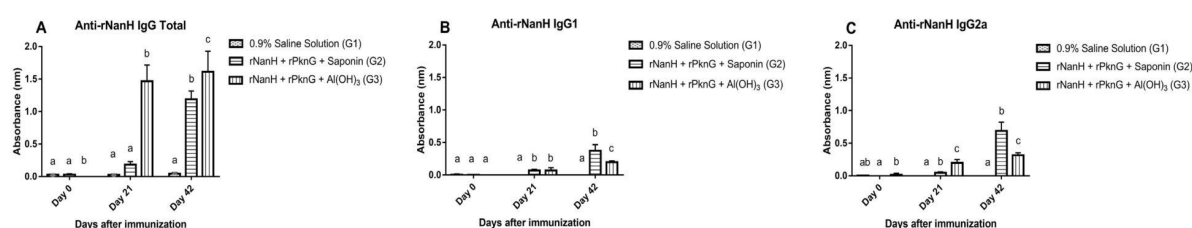


Figura 2. Determinação dos níveis de IgG total, IgG1 e IgG2a gerados contra rNanH nos dias 0 (não imunizados), 21 (primeira dose vacinal) e 42 (segunda dose vacinal).

No ELISA anti-PknG, o G2 apresentou maior produção de anticorpos comparado ao G3. O G2 ainda apresentou maiores níveis de IgG2a comparado aos níveis de IgG1. Dessa forma, os resultados tanto do ELISA anti-rNanH e ELISA anti-rPknG demonstram que no dia 42, os grupos G2 e G3, obtiveram maior produção de anticorpos ($p < 0.05$) comparado ao G1 (grupo controle).

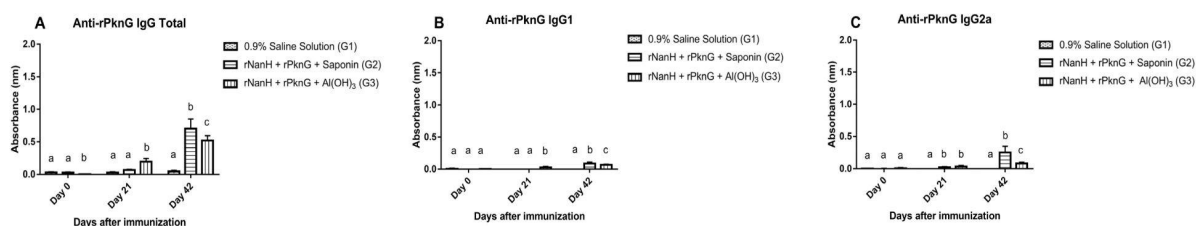


Figura 3. Determinação dos níveis de IgG total, IgG1 e IgG2a contra rPknG gerados no dia 0 (não imunizados), 21 (primeira dose vacinal) e 42 (segunda dose vacinal).

Moreira et al. (2022) relataram os benefícios da utilização de vacinas contendo mais de um antígeno, no estudo os autores co-administraram as proteínas rSpaC, rNanH, rSodC e rPLD de *C. pseudotuberculosis* em associação á uma cepa inativada de *C. pseudotuberculosis* para imunizar ovelhas, resultando em altos níveis de produção de IgG. Além disso, eles também administram uma dose de reforço contendo a proteína NanH, o que induziu um aumento na produção de anticorpos (MOREIRA et al., 2022). No presente trabalho, os níveis produzidos de anticorpos não foram tão altos, acreditamos que um fator que pode ter interferido na resposta imune é a localização citoplasmática da proteína rPknG. No entanto, este estudo demonstrou que as proteínas recombinantes de

C. pseudotuberculosis são alvos vacinais promissores, mas precisam ser melhor avaliadas.

Neste estudo, testamos dois tipos de adjuvantes na composição das formulações vacinais, o hidróxido de alumínio e a saponina. Rezende et al. (2020), utilizaram o hidróxido de alumínio associado a proteína rCP01850 de *C. pseudotuberculosis*, o autor relatou gerar uma resposta imune mista dos tipos Th1 e Th2 (REZENDE et al., 2020). Além do mais, sabemos que as saponinas podem estimular uma resposta Th1 e induzir linfócitos citotóxicos, portanto Sun et al. (2009), sugeriram que seu uso como adjuvante é adequado para vacinas de subunidades contra patógenos intracelulares (SUN et al., 2009).

Observamos em nosso estudo que os grupos experimentais G2 e G3 tiveram produção significativa de IgG total e de seus isotipos IgG1 e IgG2a. Todavia, ambas as proteínas apresentaram maior nível de produção de IgG2a, indicando uma tendência à resposta imune do tipo Th1. Por fim, por mais que G2 e G3 tenham demonstrado produção de anticorpos quando comparados com G1, G2 induziu maior nível de anticorpos, principalmente do isotipo IgG2a, esse fato pode estar relacionado ao uso do adjuvante saponina.

4. CONCLUSÕES

As formulações vacinais foram capazes de produzir níveis significativos de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a contra *C. pseudotuberculosis*. Os anticorpos produzidos demonstraram uma resposta humoral mista. Entretanto, foram observados níveis maiores do isotipo IgG2a, demonstrando uma tendência ao tipo Th1. Bem como a utilização de ambos os adjuvantes contribuiu para a produção de anticorpos, porém, a utilização de saponina associada às formulações vacinais auxiliou na maior produção de IgG2a. Nesse contexto, a avaliação da resposta imune celular é o próximo passo para certificarmos a eficácia da associação de rNanH e rPknG para formulação de vacinas contra linfadenite caseosa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DORELLA, FA; PACHECO, LGC; OLIVEIRA, SC; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium Pseudotuberculosis: Microbiology, Biochemical Properties, Pathogenesis and Molecular Studies of Virulence*. **Veterinary Research**. 2006, 37, 201–218.
- GUY, B. The Perfect Mix: Recent Progress in Adjuvant Research. **Nature Reviews Microbiol.** 2007, 5, 505–517.
- DE OLIVEIRA SILVA, M.T.; BEZERRA, F.S.B.; DE PINHO, R.B.; BEGNINI, K.R.; SEIXAS, F.K.; COLLARES, T.; PORTELA, R.D.; AZEVEDO, V.; DELLAGOSTIN, O.; BORSUK, S. Association of *Corynebacterium Pseudotuberculosis* Recombinant Proteins RCP09720 or RCP01850 with RPLD as Immunogens in Caseous Lymphadenitis Immunoprophylaxis. **Vaccine** 2018, 36, 74–83.
- MOREIRA, L.S.; LOPES, N.D.R.; PEREIRA, V.C.; ANDRADE, C.L.B.; TORRES, A.J.L.; RIBEIRO, M.B.; FREIRE, S.M.; DOS SANTOS, R.M.; D'ÁVILA, M.; NASCIMENTO, R.M.; et al. The Association of Bacterin and Recombinant Proteins Induces a Humoral Response in Sheep against Caseous Lymphadenitis. **Vaccines** 2022, 10, 1406.
- DE SÁ GUIMARÃES, A.; DO CARMO, F.B.; PAULETTI, R.B.; SEYFFERT, N.; RIBEIRO, D.; LAGE, A.P.; HEINEMANN, M.B.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; GUIMARÃES GOUVEIA, A.M. Caseous Lymphadenitis: Epidemiology, Diagnosis, and Control. **IIOAB J.** 2011, 2, 33–43.