

## AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR INDUZIDA POR rCP01850 EM ANIMAIS IMUNIZADOS COM DIFERENTES FORMULAÇÕES VACINAIS CONTRA LINFADENITE CASEOSA

LUIZA DOMINGUES MORON<sup>1</sup>; NICOLE RAMOS SCHOLL<sup>2</sup>; MARA THAIS DE OLIVEIRA SILVA<sup>2</sup>; RODRIGO BARROS DE PINHO<sup>2</sup>; ANDRÉA DE FÁTIMA SILVA REZENDE<sup>3</sup>; SIBELE BORSUK<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – moronluiza@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – nicoleramosscholl@hotmail.com; marathaisos@gmail.com; rodrigobpinho@hotmail.com

<sup>3</sup>Instituto Federal do Paraná – andrea.rezende@ifpr.edu.br

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – sibeleborsuk@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

Tendo como agente etiológico a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, a linfadenite caseosa (LC) é uma doença infectocontagiosa que acomete principalmente pequenos ruminantes (DORELLA et al., 2006). A LC é caracterizada pela formação de abscessos nos gânglios linfáticos superficiais e órgãos internos destes animais resultando em grandes perdas econômicas, com destaque em países onde a criação de ovinos e caprinos é fundamental (DORELLA et al., 2006; SEYFFERT et al. 2010).

Apesar da problemática envolvendo esta enfermidade, ainda não existem tratamentos eficazes para a doença (COSTA et al. 2011). Neste contexto, a profilaxia torna-se uma abordagem interessante para o controle da LC, podendo ainda limitar a transmissão da bactéria pelo rebanho (REZENDE et al. 2016). Entretanto, as vacinas comerciais disponíveis atualmente falham em conferir uma proteção eficaz, além de apresentarem muitos efeitos adversos (WILLIAMSON et al. 2001).

Sendo assim, estudos envolvendo a formulação de vacinas de DNA e de subunidade surgem na tentativa de minimizar essa problemática, uma vez que demonstram maiores níveis de segurança por serem baseadas em antígenos selecionados, em adição à uma otimização das formas de apresentação dos antígenos (MAZUMDER, et al. 2011). Somado a isso, SANTOS et al. (2013) demonstraram através da Análise de Densidade de Epítomos Maduros (MED) realizada no pan-secretoma de *C. pseudotuberculosis*, que o gene *cp1002\_RS01850* que codifica para a fosfatase ácida, foco deste estudo, foi ranqueada como o terceiro alvo mais imunogênico para uso em vacinas LC. Neste contexto, este estudo objetiva avaliar a resposta imune humoral e celular induzida em camundongos imunizados com diferentes formulações vacinais contendo o alvo *cp1002\_RS01850* de *C. pseudotuberculosis*.

### 2. METODOLOGIA

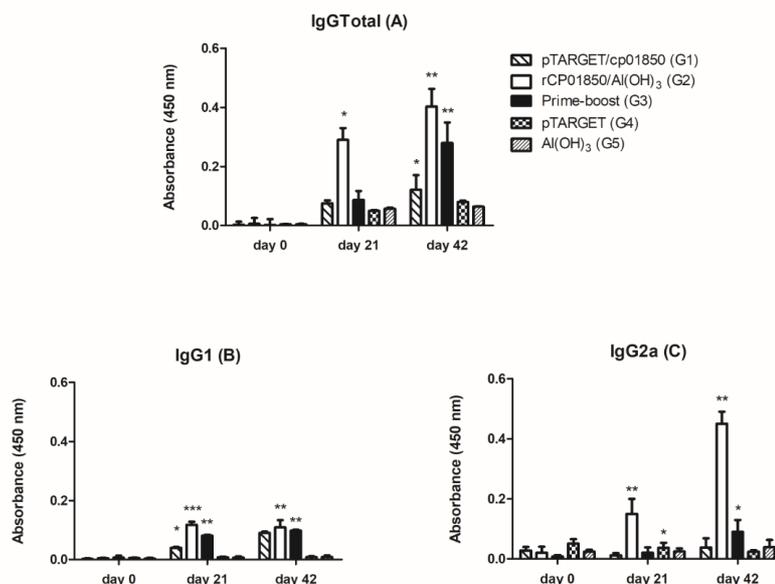
A expressão da proteína rCP01850 foi realizada em *E. coli* BL21 (DE3) conforme descrito por Rezende et al. (2016). Para a construção da vacina de DNA, o gene *cp1002\_RS01850* foi amplificado por PCR e clonado no vetor pTARGET. Para o ensaio de imunização foram utilizados 40 camundongos BALB/c fêmeas entre 6-8 semanas de idade, alocados em 5 grupos contendo 8 animais cada. Os animais foram imunizados nos dias 0, 21 e 42 por via intramuscular com: G1: inoculado com vacina de DNA (100 µL) contendo 50 µg pTARGET/*cp01850* em cada dose; G2: inoculado com 100 µL de vacina

recombinante rCP01850 (50 µg) associada ao adjuvante hidróxido de alumínio (Al(OH)<sub>3</sub>) (15%, v/v) em cada dose; G3: inoculado nos dias 0 e 21 com a vacina de DNA (*pTARGET/cp01850*), e no dia 42 com um reforço de vacina de subunidade recombinante rCP01850/Al(OH)<sub>3</sub>; G4: controle negativo, inoculado com 100 µL da vacina de DNA contendo apenas 50 µg de pTARGET; G5: controle negativo, inoculado com 100 µL de Al(OH)<sub>3</sub> (15%). Em cada grupo, 5 animais foram destinados ao ensaio de resposta imune humoral, enquanto 3 animais foram utilizados para experimentos de resposta imune celular. Amostras sanguíneas foram coletadas dos 5 animais nos dias 0, 21 e 42 e os níveis de IgG Total, IgG1 e IgG2a foram determinados por ELISA indireto. Três camundongos de cada grupo experimental foram eutanaziados 21 dias após a última imunização e tiveram os baços removidos e homogeneizados para isolamento de esplenócitos e posterior análise da expressão das citocinas IL-4, IL-10, IL-12, and IFN-γ por PCR em tempo real. A taxa de expressão gênica foi calculada em relação à expressão do gene GAPDH (PFAFFL et al. 2001).

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. As diferenças entre os grupos experimentais foram calculadas por ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. Os dados foram considerados significativamente diferentes quando  $p < 0,05$ . Testes foram realizados no software GraphPad Prism, versão 5.0.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

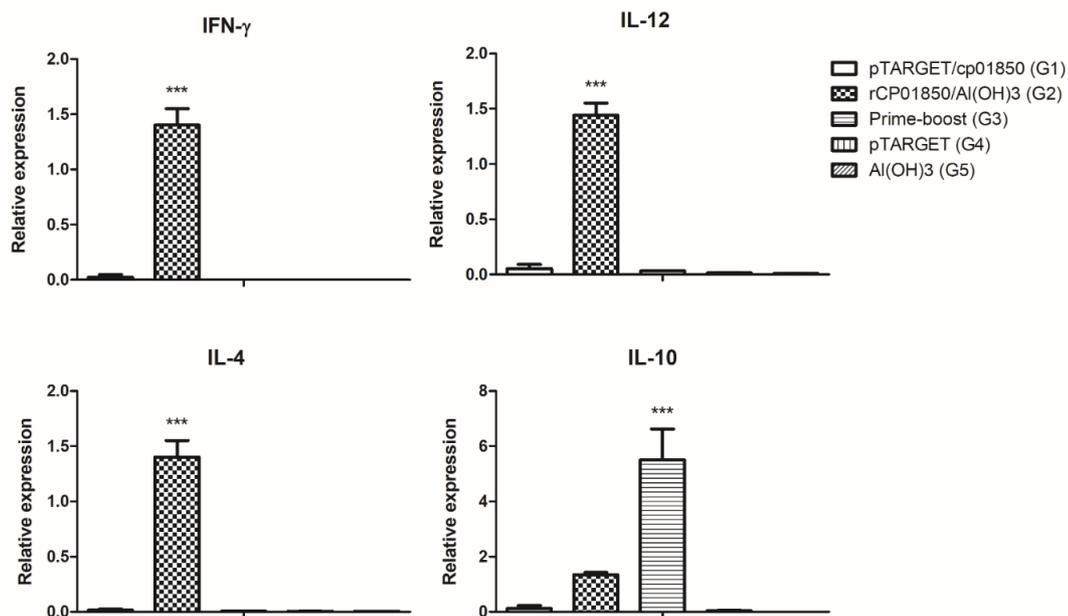
Os resultados obtidos pelo ELISA indireto demonstraram uma produção significativa de IgG total, IgG1 e IgG2a no dia 21 pós-imunização pelo grupo G2 (Figura 1). Os grupos G1 e G3 também demonstraram níveis significativamente mais elevados de IgG1 no dia 21 pós-imunização, porém, no dia 42 pós-imunização, houve uma significativa aumento nos níveis de IgG total em G1. Ainda, no dia 42 pós-imunização, G2 e G3 mostraram níveis mais elevados de IgG total, IgG1 e IgG2a ( $p < 0,05$ ), em comparação aos outros grupos (Figura 1A, 1B e 1C).



**Figura 1:** ELISA indireto contendo rCP01850 foi realizado para determinar os níveis de IgG total, IgG1 e IgG2a. Média (colunas) e desvio padrão (barras) de absorbâncias (nm) para níveis de IgG total (A), IgG1 (B) e IgG2a (C) em

camundongos BALB/c imunizados com vacina de DNA e/ou de subunidade recombinante projetadas com *cp1002\_RS01850* alvo de *C. pseudotuberculosis*. \*Resultados significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) em comparação com os controles. \*\*Resultados significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) em comparação com os outros grupos experimentais. \*\*\*Resultados significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) em comparação aos controles e aos demais grupos experimentais.

Quanto a imunidade celular, os resultados (Figura 2) mostraram que G2, inoculado com rCP01850/Al(OH)<sub>3</sub>, induziu maiores níveis de IL-4, IL-12 e IFN- $\gamma$  em comparação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ), enquanto G3, o grupo na qual a estratégia *prime-boost* foi usada, mostrou níveis significativos de IL-10 ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2:** Os níveis de transcrição das citocinas IL-4, IL-10, IL-12 e IFN- $\gamma$  foram estimados através de PCR em tempo real. Média (colunas) e desvio padrão (barras) da expressão relativa do mRNA de IL-4, IL-10, IL-12 e IFN- $\gamma$  por qRT-PCR induzida em amostras de cultura de células de esplenócitos de camundongos imunizados com vacina de DNA e/ou subunidade recombinante projetadas com *cp1002\_RS01850* alvo de *C. pseudotuberculosis*. Os resultados revelam a média de dois experimentos independentes. \*\*\*Resultados significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) em comparação aos controles e outros grupos experimentais.

Foi possível demonstrar que os animais do grupo G2 produziram níveis mais altos de IgG2a em relação aos níveis de IgG1, fato que pode estar associado a uma resposta Th1, pois esta imunoglobulina é um marcador de imunidade celular. Além disso, este grupo apresentou maiores níveis de IL-4, IL-12 e IFN- $\gamma$ , sendo estes dois últimos, importantes marcadores relacionados a resposta Th2 do tipo humoral.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo inferem que a formulação vacinal contendo o alvo rCP01850 associada ao adjuvante hidróxido de alumínio (Al(OH)<sub>3</sub>) foi capaz de induzir uma resposta mista Th1/Th2 nos animais imunizados

com a mesma, uma vez que demonstrou a estimulação das imunidades celular e humoral, extremamente importantes para o controle de *C. pseudotuberculosis*. Sendo assim, estudos utilizando *cp1002\_RS01850* como alvo em estratégias vacinais devem ser desenvolvidos afim de comprovar a sua eficácia no combate a LC.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COSTA, M. P., MCCULLOCH, J. A., ALMEIDA, S. S., DORELLA, F. A., FONSECA, C. T., OLIVEIRA, D. M., TEIXEIRA, M. F., LASKOWSKA, E., LIPINSKA, B. & other authors. Molecular characterization of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* hsp60-hsp10 operon, and evaluation of the immune response and protective efficacy induced by hsp60 DNA vaccination in mice. **BMC Res Notes** 4, 243. 2011.

DORELLA, F. A., PACHECO, L. G., OLIVEIRA, S. C., MIYOSHI, A. & AZEVEDO, V.. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Vet Res** 37, 201–218. 2006.

MAZUMDER, S., MAJI, M., DAS, A., & ALI, N. Potency, efficacy and durability of DNA/DNA, DNA/protein and protein/protein based vaccination using gp63 against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. **PloS one**, 6(2), e14644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014644>. 2011.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research** vol. 29,9, 2001.

SANTOS, A.R.; PEREIRA, V.B.; BARBOSA, E. *et al.* Mature epitope density - a strategy for target selection based on immunoinformatics and exported prokaryotic proteins. **BMC Genomics**, v.14, Supl.6, p.S4, 2013.

SEYFFERT, N., GUIMARÃES, A. S., PACHECO, L. G., PORTELA, R. W., BASTOS, B. L., DORELLA, F. A., *et al.* High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Res Vet Sci** 88, 50–55, 2010.

SILVA, M.T.O.; BEZERRA, F.S.B.; PINHO, R.B. *et al.* Association of *Corynebacterium pseudotuberculosis* recombinant proteins rCP09720 or rCP01850 with rPLD as immunogens in caseous lymphadenitis immunoprophylaxis. **Vaccine**, v.36, p.74-83, 2018.

WILLIAMSON, L.H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.**, v.17, p.359-371, 2001.

REZENDE, A., BRUM, A. A., REIS, C. G., ANGELO, H. R., LEAL, K. S., SILVA, M., SIMIONATTO, S., AZEVEDO, V., SANTOS, A., PORTELA, R. W., DELLAGOSTIN, O., & BORSUK, S. In silico identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigenic targets and application in immunodiagnosis. **Journal of Medical Microbiology**, 65(6), 521–529. 2016.

REZENDE, A.F.S., BRUM, A. A., BEZERRA, F. S. B., BRAITE, D. C., *et al.* Assessment of the acid phosphatase CP01850 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit vaccine formulations against caseous lymphadenitis. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte , v. 72, n. 1, p. 199-207. 2020 .