

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Avaliação de uma vacina recombinante de
subunidade formulada com a associação das
proteínas rPLD, rCP01850 e rCP40 de
*Corynebacterium pseudotuberculosis***

Luiza Domingues Moron

Pelotas, 2023.

Luiza Domingues Moron

Avaliação de uma vacina recombinante de subunidade formulada com a associação das proteínas rPLD, rCP01850 e rCP40 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

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 do Conhecimento: Biotecnologia).

Orientador: Sibele Borsuk

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M868a Moron, Luiza Domingues

Avaliação de uma vacina recombinante de subunidade formulada com a associação das proteínas rPLD, rCP01850 e rCP40 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* / Luiza Domingues Moron ; Sibele Borsuk, orientadora. — Pelotas, 2023.

59 f.

Dissertação (Mestrado) — Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Desenvolvimento de vacina. 2. Associação antigênica. 3. Hidróxido de alumínio. 4. Linfadenite caseosa. 5. Vacina multiantigênica. I. Borsuk, Sibele, orient. II. Título.

CDD : 615.372

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a Thaís Larré Oliveira Bohn (Universidade Federal de Pelotas, CDTec)

Prof. Dr^a Daniela Fernandes Ramos (Universidade Federal do Rio Grande, FURG)

Dr^a. Mirna Samara Dié Alves (Suplente, Universidade Federal de Pelotas, PNPD/CDTec)

Prof. Dr^a. Sibele Borsuk (Orientadora, Universidade Federal de Pelotas, CDTec)

Para minha família e a todos que me acompanharam nesta caminhada.

Dedico.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a minha família, meus avós e minha tia-avó. Agradeço em especial minha mãe Eliana, por ser exemplo de uma mulher forte, sensível, ética e batalhadora. É principal fonte de minha admiração e acalento, sempre fazendo parte da minha trajetória acadêmica tanto quanto a pessoal. Serei eternamente grata pelo teu amor incondicional.

Agradeço a minha orientadora, Sibeles Borsuk, pela oportunidade de desenvolver meu trabalho sob sua supervisão e por ter me recebido desde a graduação, muito feliz em ter sua participação todos esses anos no meu desenvolvimento como cientista.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária: Bárbara, Tallyson, Nicole, Adriane e Guilherme e a todos os estagiários que de alguma forma fizeram parte desta etapa. Vocês foram muito importantes assim como todas as nossas trocas diárias independente se eram profissionais ou casuais. Saibam que os levarei sempre comigo e como exemplo de amizade dentro do local de trabalho.

Às minhas amigas Alice, Carol e Tiffany pelo companheirismo de sempre, pela compreensão, pelo carinho e pelo colo. Fico muito feliz que nos encontramos e o destino nos permitiu traçar nosso caminho sempre juntas. À Mirna, minha colega de laboratório, profissão e grande amiga, foram incontáveis as vezes que me escutou, me aconselhou e me ajudou, és uma mulher incrível.

Finalmente agradeço à banca pelas contribuições, à Universidade Federal de Pelotas pela estrutura, aos órgãos de fomento que permitiram que eu desenvolvesse este trabalho e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Agradeço também aos servidores, professores, colegas e a todos que de alguma forma impactaram esse período em que era mestranda.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Não há nada a temer na vida, apenas tratar de compreender”

Marie Curie

Resumo

MORON, Luiza Domingues. **Avaliação de uma vacina recombinante de subunidade formulada com a associação das proteínas rPLD, rCP01850 e rCP40 de *Corynebacterium pseudotuberculosis***. 2023. 59f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A Linfadenite caseosa (LC) é uma doença infectocontagiosa que afeta principalmente caprinos e ovinos, sendo o seu agente etiológico a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Devido a formação de abscessos nos linfonodos superficiais e nos órgãos internos desses animais, esta doença gera impacto econômico na ovinocaprinocultura. Atualmente, as vacinas comerciais disponíveis não apresentam proteção eficaz e ainda podem apresentar efeitos adversos. A partir disto, a utilização da tecnologia de produção de proteínas recombinantes, especialmente de formulações de vacinas de subunidade apresenta-se como um possível nova abordagem, uma vez que demonstra maiores níveis de segurança, bem como a utilização destes antígenos em associação a fim de induzir melhores níveis de proteção. Ademais, o uso de antígenos em associação pode ser outra estratégia na busca de melhores níveis de proteção. Dois importantes alvos vacinais presentes em *C. pseudotuberculosis* já foram caracterizados sendo estes as proteínas PLD e CP40. Além disso, a proteína rCP01850 já demonstrou estimular a produção de resposta humoral e foi aplicada com sucesso em imunodiagnóstico da LC. No presente estudo, para avaliação da associação das proteínas purificadas rPLD, rCP01850 e rCP40 em uma formulação vacinal, cinco grupos contendo 10 camundongos Balb/c foram estabelecidos, sendo eles: G1- solução salina 0,9%, G2- rPLD/ $\text{Al}(\text{OH})_3$, G3- rCP01850/ $\text{Al}(\text{OH})_3$, G4- rCP40/ $\text{Al}(\text{OH})_3$ e G5- rPLD, rCP01850 e rCP40/ $\text{Al}(\text{OH})_3$ e todos os grupos foram imunizados com duas doses com intervalo de 21 dias e desafiados no dia 42 com 10^4 UFC da cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*. As taxas de proteção obtidas foram de G3 (30%), G2 e G4 (80%) e G5 (100%). Todos os animais do grupo controle (G1) vieram a óbito. A vacina com a associação de proteínas (G5) produziu anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a contra as proteínas rPLD, rCP01850 e rCP40, entretanto os níveis não foram significativos quando comparados aos grupos com formulações contendo as mesmas proteínas recombinantes purificadas, porém de forma individual (G2, G3 e G4). No entanto, deve-se considerar que em G5 todos os animais sobreviveram ao desafio com a cepa virulenta, o que sugere que outro tipo de resposta imune, possivelmente a resposta celular está envolvida na sobrevivência desses animais. Considerando que no grupo G5 a imunização resultou na total sobrevivência desses animais, a associação das proteínas rPLD, rCP01850 e rCP40, pode ser considerada uma estratégia promissora para LC e deve ser avaliada em mais detalhes.

Palavras-chave: Desenvolvimento de vacina, Associação antigênica, Hidróxido de alumínio, Linfadenite caseosa, Vacina multiantigênica.

Abstract

MORON, Luiza Domingues. Evaluation of a subunit recombinant vaccine formulated with the association of rPLD, rCP01850 and rCP40 proteins from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 2023. 59f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Caseous lymphadenitis (CLA) is an infectious disease with worldwide incidence, and it mainly affects goats and sheep and its etiological agent is the bacterium *Corynebacterium pseudotuberculosis*. By causing the formation of abscesses in these animals' superficial lymph nodes and internal organs, it generates an economic impact on sheep and goat farming. Currently, commercial vaccines do not provide effective protection and still show many adverse effects. Taking this into consideration, using recombinant protein production technology to develop subunit vaccine formulations is presented as a suitable approach since it leads to greater safety levels. In addition, using antigens in an association can be another strategy when seeking better protection levels. Two important vaccine targets produced by the pathogen have already been characterized: the PLD and CP40 proteins. In addition, the rCP01850 protein has already been shown to stimulate the production of humoral response and is also useful for immunodiagnostics. In the present study, to evaluate the association of purified rPLD, rCP01850 and rCP40 proteins in a vaccine formulation, five groups containing 10 Balb/c mice were established as follows G1 - 0.9% saline solution, G2 - rPLD/Al(OH)₃, G3 - rCP01850/ Al(OH)₃, G4 - rCP40/ Al(OH)₃, and G5 - rPLD, rCP01850 and rCP40/ Al(OH)₃. All groups were immunized with two vaccine doses within a 21-day interval and challenged on day 42 with 10⁴ CFU of the virulent MIC-6 strain of *C. pseudotuberculosis*. The protection rates after the challenge were 30% (G3), 80% (G2 and G4), and 100% (G5). All animals in the control group reached the endpoint. The multiple protein-associated vaccine formulation (G5) induced the production of total IgG, IgG 1, and IgG2a antibodies against rPLD, rCP01850 and rCP40 proteins, however, this production did not show statistical difference when compared with the individual groups (G2, G3 and G4). However, it should be considered that in G5 all animals survived the challenge with the virulent strain, which suggests that another type of immune response, possibly the cellular response, is involved in the survival of these animals. Thus, considering that in the G5 group, immunization resulted in total survival of these animals, the association of rPLD proteins, rCP01850 and rCP40, should be considered a promising strategy for CLA as well as being further evaluated more thoroughly.

Keywords: Vaccine development, Antigenic association, Aluminum hydroxide, Caseous lymphadenitis, Multiantigenic vaccine.

Lista de Figuras

- Figura 1.** (A) Avaliação da expressão e purificação das proteínas recombinantes. **(1)** rCP40; **(2)** rCP01850 e **(3)** rPLD, todas purificadas. **(B)** Caracterização da identidade das proteínas recombinantes através de Western blot utilizando anticorpo monoclonal anti-6x His tag. **(1)** Marcador de peso molecular pré-corado; **(2)** rCP01850; **(3)** rPLD ; **(4)** rCP40, purificadas.....35
- Figura 2.** Sobrevivência de camundongos Balb/c imunizados com as proteínas rPLD, rCP01850 e rCP40 após desafio virulento com *C. pseudotuberculosis*. Foram utilizados dez camundongos em cada grupo e os animais foram observados por 40 dias. As curvas de sobrevivência foram comparadas usando análise de Log-rank e teste exato de Fisher ($p < 0,05$).....36
- Figura 3.** Determinação dos níveis de IgG total, através de ELISA indireto contra as proteínas rPLD **(A)**, rCP01850 **(B)** e rCP40 **(C)** em camundongos imunizados com diferentes formulações contendo as proteínas recombinantes. As amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 21 e 42 do experimento. Os testes foram realizados em cada grupo com 10 animais e os resultados estão apresentados como média (colunas) e desvio padrão (barras) de absorbâncias (nm).....38
- Figura 4.** Determinação dos níveis de IgG1, através de ELISA indireto contra as proteínas rPLD **(A)**, rCP01850 **(B)** e rCP40 **(C)** em camundongos imunizados com diferentes formulações contendo as proteínas recombinantes. As amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 21 e 42 do experimento. Os testes foram realizados em cada grupo com 10 animais e os resultados estão apresentados como média (colunas) e desvio padrão (barras) de absorbâncias (nm).....39
- Figura 5.** Determinação dos níveis de IgG2a, através de ELISA indireto contra as proteínas rPLD **(A)**, rCP01850 **(B)** e rCP40 **(C)** em camundongos imunizados com diferentes formulações contendo as proteínas recombinantes. As amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 21 e 42 do experimento. Os testes foram realizados em cada grupo com 10 animais e os resultados estão apresentados como média (colunas) e desvio padrão (barras) de absorbâncias (nm).....41

Lista de Abreviaturas

ANOVA – Analysis of Variance (Análise de Variância)

BCA – Bicinchoninic Acid (Ácido Bicinconínico)

BHI - Brain and Heart Infusion (Infusão Cérebro Coração)

CLA – Caseous Lymphadenitis (Linfadenite Caseosa)

DAB – Diaminobendizina

DL – Dose Letal

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

DO – Densidade Óptica

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima)

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFN- γ – Interferon Gama

IgG – Imunoglobulina G

IPTG – Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo

LB – Luria-Bertani

LC – Linfadenite Caseosa

M – Molar

NanH – Neuraminidase H

ng – Nanograma

SDS-PAGE – Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

(Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil- sulfato de sódio (SDS))

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	17
2.2 Linfadenite caseosa	18
2.3 Epidemiologia.....	18
2.4 Transmissão.....	19
2.5 Patogênese e virulência.....	20
2.6 Diagnóstico	22
2.7 Tratamento, Controle e Profilaxia.....	24
2.8 Vacinas comerciais e experimentais.....	24
2.9 PLD, CP01850 e CP40	27
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	29
3.1 Hipótese	29
3.2 Objetivo Geral	29
3.3 Objetivos Específicos	29
4 CAPÍTULOS	30
4.1 Relatório de Atividades	30
4.1.1 Material e Métodos	30
4.1.1.1 Locais dos experimentos	30
4.1.1.2 Cepas e condições de cultivo	30
4.1.1.3 Expressão e purificação das proteínas rPLD, rCP01850 e rCP40.....	30
4.1.1.4 <i>Western blot</i>	31
4.1.1.5 Ensaio de imunização.....	32
4.1.1.6 Determinação da dose letal 50 (DL50) e ensaio de desafio	32

4.1.1.7 Avaliação da resposta imune humoral	33
4.1.1.8 Análises estatísticas	34
4.1.2 Resultados	34
4.1.2.1 Expressão, purificação e confirmação de identidade das proteínas ...	34
4.1.2.2 Avaliação da proteção vacinal após o desafio	35
4.1.2.3 Avaliação da resposta imune humoral	36
5 DISCUSSÃO GERAL	42
6 CONCLUSÃO	45
7 REFERÊNCIAS	46
8 ANEXOS	56
Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal	56

1 INTRODUÇÃO GERAL

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença infectocontagiosa que acomete principalmente pequenos ruminantes, como caprinos e ovinos (Williamson, 2001). A LC é caracterizada pela formação de abscessos nos gânglios linfáticos superficiais e órgãos internos destes animais acarretando grandes perdas econômicas com destaque aos países onde a ovinocaprinocultura é de extremo interesse financeiro (Dorella et al., 2006). Altas prevalências de LC foram reportadas em países como: Austrália (61 %) e Estados Unidos (43 %), e na província de Quebec no Canadá, na qual estas taxas variaram entre 21 % e 36 % (De Sá Guimarães et al., 2011). No Brasil, a estimativa de prevalência clínica é de 30 % nestes rebanhos, valor importante quando se é considerado que no país, o rebanho caprino é estimado em 11.923.630 de cabeças e o rebanho ovino tem uma estimativa de 20.537.474 cabeças (IBGE, 2021; Seyffert et al., 2010; Barnabé et al., 2020).

A LC apresenta-se de duas formas: LC externa, caracterizada pela formação de abscessos nos linfonodos superficiais e órgãos externos, os quais podem se romper e liberar secreções contendo o patógeno causador da doença; e LC visceral, caracterizada por abscessos nos gânglios linfáticos internos e outros órgãos como os pulmões, fígado e rins (Windsor, 2011; Varela-Castro et al., 2017; G. J. Baird & Fontaine, 2007).

O agente etiológico da LC é *Corynebacterium pseudotuberculosis*, uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa, não-esporulante, pleomórfica, e não-encapsulada (G. J. Baird & Fontaine, 2007). Esta bactéria pertence ao grupo dos actinomicetos, e é integrante do grupo CMNR juntamente aos gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, que apresentam como características em comum além dos ácidos micólicos, a presença de um alto índice de guanina e citosina no genoma (Dorella et al., 2006). Em condições laboratoriais, *C. pseudotuberculosis* é sensível a antibióticos como penicilina. Contudo, *in vivo* as bactérias se encontram no interior de granulomas, cápsulas fibrosas que acabam reduzindo de forma considerável o acesso destes antibióticos (Costa et al., 2011; Droppa-Almeida et al., 2018). Somado a isso, o diagnóstico clínico da doença não é sempre confiável, pois a maioria dos animais podem ser confundidos como saudáveis pois quando já possuem

a forma visceral podem parecer assintomáticos. Sendo assim, a melhor alternativa é a profilaxia (Rezende et al., 2020).

Atualmente, as vacinas comerciais disponíveis falham em conferir uma proteção eficaz, necessitam de doses de reforços anuais e podem apresentar muitos efeitos adversos como febre e letargia, ou ainda ocasionar o desenvolvimento de abscessos superficiais e profundos (Williamson, 2001). Neste contexto, estudos envolvendo a formulação de vacinas de subunidade recombinante tornam-se interessantes, uma vez que demonstram maiores níveis de segurança por serem baseadas em antígenos selecionados e purificados e permitirem ainda a utilização destes antígenos em associação visando melhores níveis de proteção (Rezende et al., 2020; Silva et al., 2020; Silva et al., 2018).

Dentre os antígenos estudados, pode-se citar a proteína fosfolipase D (PLD), importante fator de virulência de *C. pseudotuberculosis* e responsável por facilitar a disseminação da bactéria pela corrente sanguínea (Silva et al., 2018). Esta exotoxina está presente de forma inativada em diversas vacinas comerciais, ou ainda como antígeno em vacinas de subunidade (Silva et al., 2018; Pinho et al., 2021). Fontaine e colaboradores em 2006 utilizaram PLD recombinante e juntamente com uma bactéria inativada feita a partir de uma cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis* para formulação de uma vacina combinada que induziu um alto nível de proteção contra LC. Outro estudo empregou PLD recombinante expressa em *M. bovis* BCG Pasteur, e promoveu 88 % de proteção em camundongos desafiados com a cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis* (Leal et al., 2018).

Outro alvo já avaliado é a proteína de 40 kilodaltons identificada por Wilson e colaboradores em 1995 denominada CP40. Anteriormente descrita como uma serino-protease, atualmente existem indícios que demonstram essa proteína como uma endoglicosidase, ademais já foi encontrada no sobrenadante de cultivos da bactéria *C. pseudotuberculosis* e pode estar associada com sua virulência (Droppa-Almeida et al., 2016; (Shadnezhad et al., 2016). A proteína purificada já apresentou resultados indicando produção de resposta humoral, bem como uma taxa de proteção de 100% contra o desafio mesmo com a utilização de dois diferentes adjuvantes (Saponina e Adjuvante Completo de Freund) (Droppa-Almeida et al., 2016).

Recentemente, Bezerra e colaboradores (2020) avaliaram em combinação ao extrato hidroalcolico de própolis vermelha brasileira (BRP) a proteína recombinante CP01850, uma fosfatase ácida que demonstrou propriedades imunoestimulantes, induzindo respostas celulares e humorais. A proteína rCP01850 foi ranqueada anteriormente por Rezende e colaboradores em 2020 segundo a análise MED (Densidade de Epítomos Maduros) como um dos alvos mais promissores para uso em vacinas para LC. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que a proteína rCP01850 obteve excelentes níveis de sensibilidade (90 %) e especificidade (92,5 %) em ensaios imunoenzimáticos.

A associação de proteínas visando a proteção contra doenças vêm sendo explorada em estudos envolvendo diferentes patógenos, como no caso da combinação de antígenos recombinantes para proteção contra neosporose bovina, que aumentou em quase 20% a taxa de sobrevivência de camundongos infectados com *Neospora caninum* (Pastor-Fernández et al., 2015) e para proteínas conjugadas para vacinas contra malária que aumentaram significativamente os níveis de anticorpos específicos quando comparadas ao antígeno sozinho (Qian et al., 2007). Ademais, Duarte e colaboradores (2016) demonstraram que a associação entre os dois antígenos de *Leishmania braziliensis* possibilitou uma redução expressiva da carga parasitária em camundongos desafiados com *Leishmania infantum*, bem como uma resposta imune robusta.

Em vacinas para LC, a associação das proteínas rCP01850 e rPLD adjuvadas com saponina demonstrou taxas de sobrevivência de 50 %, enquanto a formulação contendo apenas rPLD obteve uma taxa de 30 %, demonstrando a importância da utilização de diferentes alvos vacinais na mesma formulação vacinal (Silva et al., 2018). Em um estudo avaliando a utilização da proteína recombinante CP40 combinada à uma cepa mutada do patógeno denominada CP09 em uma formulação vacinal obteve-se uma taxa de sobrevivência de 70 % (Silva et al., 2014) . Ademais, Barral e colaboradores em 2022 construíram uma proteína fusionada denominada MBP:PLD:CP40 que conferiu uma taxa de proteção de 57,14 % nos animais desafiados. O grupo contendo apenas as proteínas rPLD e rCP40 também apresentou uma taxa satisfatória de proteção de 42,86 % no mesmo estudo (Barral et al; 2022).

Deste modo, no presente estudo objetivou-se o desenvolvimento de uma formulação vacinal a partir da associação das proteínas recombinantes rPLD, rCP01850 e rCP40 visando a proteção de camundongos contra o desafio com a cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*, assim como a avaliação da resposta humoral induzida.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Pertencente ao grupo de actinomicetos com caráter heterogêneo denominado CMNR (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*), *Corynebacterium pseudotuberculosis* é uma bactéria gram-positiva, não esporulante, anaeróbia e intracelular facultativa, com tamanho estimado em torno de 0,5 a 0,6 µm que pode apresentar-se em forma cocóide, bastão filamentoso ou ainda quando em grupo no formato de letras chinesas (Dorella et al., 2006; de Sá Guimarães et al., 2011). Os componentes desse grupo apresentam características comuns como a presença de ácidos micólicos e galactose arabinose em suas paredes celulares, bem como alto conteúdo G+C (47-74 %) no seu genoma (de Sá Guimarães et al., 2011).

Descrito pela primeira vez em 1888 após ser isolado por Edward Nocard a partir de um caso de linfangite bovina e em 1891 por Hugo von Preisz a partir de um abscesso renal de uma ovelha, o patógeno foi chamado por décadas de bacilo de Preisz-Nocard e recebeu sua atual nomeação de *C. pseudotuberculosis* (devido a semelhança com lesões causadas pela tuberculose) apenas em 1948 (G. J. Baird & Fontaine, 2007). Esta bactéria possui melhor crescimento em condições em que a temperatura é em torno de 37 °C e pH entre 7,0 e 7,2, e sua organização pode se dar em forma de grupos ou paliçadas com colônias secas, opacas e com anéis concêntricos e sua coloração pode variar de creme à laranja (Dorella et al., 2006a).

Com grande importância veterinária, *C. pseudotuberculosis* é o agente etiológico da linfadenite caseosa. Nesse sentido, é importante ressaltar a presença de dois biovars na espécie, os biovars *equi* e *ovis* cuja principal diferença bioquímica reside na capacidade de reduzir o nitrato a nitrito, enquanto o biotipo *equi* é nitrato redutase positivo e infecta principalmente equinos, o biovar *ovis* é nitrato redutase negativo e infecta ovinos e caprinos (Billington et al., 1988; Almeida et al., 2017).

2.2 Linfadenite caseosa

Acometida por pequenos ruminantes como caprinos e ovinos, a doença infectocontagiosa denominada de linfadenite caseosa (LC) afeta diretamente estes animais através principalmente de consequências como a redução da produção de lã, carne e leite, além do declínio na fecundidade e ainda a condenação de carcaças (Williamson, 2001; Dorella et al., 2006).

Identificada pela primeira vez em 1888 e possivelmente disseminada através de ovelhas importadas no século XVIII, a LC é caracterizada pela formação de abscessos (“mal do carço”) nos gânglios linfáticos superficiais e órgãos internos de pequenos ruminantes acarretando grandes perdas econômicas principalmente em países com elevados números de rebanhos de caprinos e ovinos (Dorella et al., 2006; Windsor, 2011). Diferentemente de outras bactérias piogênicas, os abscessos causados pela doença geralmente acometem o rebanho de forma geral e não isoladamente (Oreiby, 2015).

Dependendo do local de formação do piogranuloma, a LC apresenta-se nas formas externa e interna. A LC externa geralmente presente em animais mais jovens é caracterizada pela formação de abscessos nos linfonodos superficiais como retrofaríngeos, parotídeos, e submandibulares, os quais podem se romper e liberar secreções contendo a bactéria no ambiente, facilitando assim a infecção de outros animais do mesmo rebanho (Ruiz et al., 2020; Windsor, 2011).

Já a forma visceral é caracterizada por abscessos nos gânglios linfáticos internos (linfonodos mediastinais ou mesentéricos) e outros órgãos como os pulmões, fígado e rins (Varela-Castro et al., 2017; Baird & Fontaine, 2007). Ademais, estas lesões podem ser reconhecidas em outros órgãos como coração, testículos, útero e encéfalo, porém trata-se de casos esporádicos (Souza et al., 2012).

2.3 Epidemiologia

Apesar da subnotificação a LC já foi identificada no mundo todo, principalmente em áreas com altos números de rebanhos de caprinos e ovinos (de Sá Guimarães et al., 2011). De acordo com a Organização Mundial de Saúde Animal nos anos entre

1996-2004, 64 países reportaram casos de linfadenite caseosa nos animais. Por conseguinte, já existem publicações relatando índices relativamente altos de prevalência para LC em países como: Austrália (61 %), Estados Unidos (43 %) e no Canadá, onde na província de Quebec as taxas variaram entre 21 % e 36 % (de Sá Guimarães et al., 2011). Essas taxas também variaram em outros países como França (2,3 % e 5,6 %), Polônia (1,5 %), Itália (1,3 % e 4,4 %) e ainda no Reino Unido a soroprevalência da doença é estimada em 9,93% (Ruiz et al., 2020). Ademais, no Egito as taxas de soroprevalência estimadas da doença em ovelhas variam de 3,71 % a 6,78 % dependendo da região (Magdy Selim et al., 2022). Em outros locais como nas Ilhas Malvinas e na Malásia, estas estimativas podem chegar a 24 % e 30 % respectivamente (Ruiz et al., 2020).

No Brasil, a doença é apontada como endêmica e a estimativa de prevalência clínica é de 30 % nos rebanhos caprinos e ovinos, valor expressivo principalmente considerando que os rebanhos de caprinos e ovinos representam mais de 30 milhões de animais no país (IBGE, 2021; Seyffert et al., 2010; Barnabé et al., 2020). Em um estudo realizado no estado do Rio de Janeiro, a prevalência sorológica apresentou uma variação de 3,6-100 % e em Minas Gerais as taxas foram de 75,8 % para ovinos e 78,9 % para caprinos após análise soroepidemiológica (de Sá Guimarães et al., 2011). Na região nordeste brasileira, a qual a ovinocaprinocultura é uma das principais fontes de renda e alimento dos produtores, um estudo relatou uma soroprevalência de 93,88 % dentre os rebanhos avaliados, e ainda, obteve uma taxa de 37,46 % quando os animais foram testados individualmente (Alves et al., 2020).

É de suma importância que o controle da doença, esteja associado a boas práticas de manejo, visto que a bactéria pode infectar um rebanho de forma rápida ou ainda sigilosa (Alves et al., 2020). No entanto, no Brasil não existe um programa de controle oficial da infecção, sendo assim muitos produtores podem falhar no manejo e nas práticas preventivas (quarentena de animais novos no rebanho, por exemplo) facilitando a disseminação da bactéria nos animais (Alves et al., 2020).

2.4 Transmissão

A transmissão de *C. pseudotuberculosis* se dá principalmente pela ruptura ou lesão na pele permitindo a invasão da bactéria no hospedeiro, ou ainda através do

contato com abscesso rompido, bem como a transmissão pelo trato oral/respiratório (Barnabé et al., 2020). Quando um abscesso se desenvolve no parênquima pulmonar e acaba sofrendo uma ruptura, a infecção pode se espalhar pelo trato respiratório, assim contaminando outros animais por meio de aerossóis gerados por estes (O'Reilly et al., 2008).

Outra importante fonte de contaminação são fômites utilizados no manejo e rotina dos animais como a castração, identificação com brincos ou tatuagens, bem como na drenagem de abscessos ou ainda através de vetores mecânicos como a mosca doméstica (De Sá Guimarães et al., 2011). O sexo dos animais também pode ser um fator a ser considerando, pois, carneiros tendem a apresentar maiores números de soropositivos quando comparados as ovelhas do mesmo rebanho por motivos comportamentais (disputas por dominância podem levar ao rompimento de abscessos de animais contaminados) (G. Baird, 2000).

Animais adquiridos de outros lugares que não passaram por um controle rígido e uma quarentena também são responsáveis pelos altos números de transmissão nos rebanhos, juntamente com a possível falta de higiene das instalações e negligência de cuidadores (Porto et al., 2013). Para mais, o patógeno apresenta a capacidade de sobreviver de forma perdurável no ambiente, seja no solo (oito meses), na palha (três semanas) ou no feno (quatro meses) e este microrganismo já foi identificado em locais previamente contaminados com pus cerca de cinco meses após a exposição (de Sá Guimarães et al., 2011). A LC é considerada uma potencial zoonose e pessoas infectadas geralmente são pecuaristas que trabalham diretamente com animais infectados ou açougueiros, no entanto são casos isolados e não apresentam números expressivos até o momento (Gascoigne et al., 2020).

2.5 Patogênese e virulência

Tratando-se de uma bactéria intracelular facultativa, após a entrada de *C. pseudotuberculosis* no organismo do hospedeiro através de mucosas ou possíveis lesões, o estabelecimento dessa bactéria se dá principalmente pela sua multiplicação no interior de macrófagos (de Sá Guimarães et al., 2011). A partir do momento em que o patógeno entra na corrente sanguínea e é transportado especialmente pelo

sistema linfático juntamente com a penetração nas células- alvo, a sua sobrevivência pode-se dar ao fato do patógeno interferir na eficiência da atividade das enzimas do hospedeiro na fusão fagolisossômica impedindo a eliminação da bactéria (de Sá Guimarães et al., 2011; Bastos, 2012).

Um importante fator de virulência de *C. pseudotuberculosis* é a exotoxina fosfolipase D (PLD) (G. J. Baird & Fontaine, 2007). A PLD atua como um fator de permeabilidade potencializando a disseminação da bactéria no organismo do hospedeiro, através da hidrólise das ligações éster da esfingomielina em membranas celulares de mamíferos (Dorella et al., 2006). Além disso, essa exotoxina também pode atuar na formação de lesões dermonecroticas, facilitando a passagem do patógeno da derme para os vasos sanguíneos e em seguida para os vasos linfáticos (Bastos, 2012). É importante salientar que a PLD já foi identificada em todas as cepas de *C. pseudotuberculosis* estudadas, sendo encontrada no sobrenadante dos cultivos celulares dessas bactérias, ademais em cepas com o gene codificante para PLD silenciado, o potencial causador de abscessos foi reduzido (Baird & Fontaine, 2007).

O período de infecção da LC normalmente apresenta três fases, nestas a bactéria faz o (i) recrutamento de células fagocíticas, (ii) amplificação e desenvolvimento de granuloma piogênico seguido então da fase de (iii) estabilização e persistência desta lesão granulomatosa (Bastos, 2012). A formação destes granulomas é uma tentativa do sistema imune de reduzir o espalhamento da infecção, contudo quando estes abscessos são drenados pelo sistema linfático, as lesões acabam se estendendo para outros órgãos (Baird & Fontaine, 2007). A dificuldade da ação de enzimas no fagolisossoma para eliminação do microrganismo pode estar associada a presença da camada lipídica da bactéria que acaba detendo a fagocitose, possibilitando a sobrevivência desta de forma intracelular (de Sá Guimarães et al., 2011).

Dentre outros possíveis fatores que podem contribuir com a virulência de *C. pseudotuberculosis* está a presença de genes relacionados a absorção de ferro pelo patógeno denominados (fag) A, B, C e D, de grande relevância para sobrevivência deste em ambientes com pouca disponibilidade de ferro (Billington et al., 2002). Somado a isso, endoglicosidase de 40 kilodaltons designada CP40 que é reconhecida por soros de animais em estágio inicial da infecção, além de ser uma proteína

encontrada no sobrenadante de cultivos de *C. pseudotuberculosis* (Walker et al., 1994; Dorella et al., 2009; Shadnezhad et al., 2016).

No que diz respeito a ativação do sistema imune do hospedeiro, outro parâmetro de grande importância que deve ser avaliado são os perfis de expressões de citocinas, tendo em vista que se trata de uma bactéria intracelular facultativa. A produção de TNF- α e IL-6 e citocinas associadas a células T já foram elucidadas no sítio de inoculação e nos linfonodos respectivamente (Pépin et al., 1997). Ademais, as citocinas IFN- γ e TNF- α também já foram identificadas como possíveis mecanismos de resistência a infecção primária, supostamente através da ativação de macrófagos (Dorella et al., 2009; de Sá Guimarães et al., 2011).

2.6 Diagnóstico

Presentemente o diagnóstico de linfadenite caseosa têm como base os sintomas clínicos da doença, como a presença de abscessos os quais têm o seu material coletado para análise e verificação da presença de *C. pseudotuberculosis* através de cultivo celular seguido de análises bioquímicas (Dorella et al., 2009; Bastos, 2012). Um teste que pode ser empregado para análise do material caseoso é chamado API Coryne (API-bioMérieux, Inc., La Balme les Grottes, France) o qual realiza 21 análises bioquímicas para identificação de bactérias corineformes em amostras (Soto et al., 1994). Contudo, a manipulação desse material purulento pode infectar a pele do animal, o ambiente ou ainda o rebanho (Bastos, 2012).

O emprego de técnicas moleculares como o PCR também pode ser utilizado no diagnóstico da doença, um exemplo é a técnica de PCR multiplex que demonstrou boa especificidade e sensibilidade com a amplificação de três genes de *C. pseudotuberculosis* (Pacheco et al., 2007). Um método alternativo é a análise de restrição do gene da subunidade β da RNA polimerase, que é amplificado por PCR para identificar *C. pseudotuberculosis*, contudo testes baseados nessa técnica não possibilitam o diagnóstico da doença no estágio subclínico (Pavan et al., 2012). Foram desenvolvidos também métodos adicionais, como (Cameron et al., 1972), imunodifusão dupla, hemaglutinação indireta (Burrell, 1980) e inibição da hemólise (Brown et al., 1987), para detectar a LC subclínica. No entanto, esses métodos têm

limitações em termos de sensibilidade ou especificidade, o que restringe a capacidade de identificar a doença de forma precisa (Dorella et al., 2006a).

Dentre os testes sorológicos pode-se citar também a técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) utilizada em diferentes estudos para diagnóstico de linfadenite caseosa. Um estudo conduzido por Binns e colaboradores em 2007 utilizou antígenos de *C. pseudotuberculosis* os quais foram obtidos através da sonicação do cultivo e o teste apresentou uma especificidade de 71 % e uma sensibilidade de 83 % para o diagnóstico em ovinos. Rebouças e colaboradores (2013), também utilizaram antígenos secretados, especificamente pela cepa T1 de *C. pseudotuberculosis* em meio de cultivo buscando detectar anticorpos específicos em soros de ovinos e obtiveram elevados níveis de especificidade (99 %) e sensibilidade (89 %).

Além disso, foram realizados outros testes utilizando a exotoxina PLD purificada do sobrenadante da cultura de *C. pseudotuberculosis*, juntamente com soro policlonal produzidos em coelhos anti-PLD como anticorpo de captura. Esses testes resultaram em uma especificidade de 99 % e uma sensibilidade de 79 % em ovinos (Baird & Fontaine, 2007). Por fim, um teste imunoenzimático para detectar interferon gama (IFN- γ) como marcador de imunidade mediada por células do hospedeiro contra o patógeno foi avaliado em soros de ovinos e caprinos, porém a sensibilidade do ensaio foi de 55,8 % e 56 %, enquanto a especificidade foi de 100 % e 93 %, respectivamente.

Ainda considerando os testes sorológicos, já existem estudos avaliando também a utilização de proteínas recombinantes como insumo para diagnóstico. Rezende e colaboradores em 2016 realizaram um estudo buscando ranquear in silico alvos antigênicos para sua utilização em estratégias de vacinologia e imunodiagnóstico para linfadenite caseosa em ovinos. Neste, os três principais alvos classificados foram a CP0126a, CP0369 e CP1957, e alcançaram uma especificidade de 77,5 %, 92,5 % e 92,5 %, e sensibilidade de 95 %, 90 % e 85 %, respectivamente. Ademais, as proteínas recombinantes rPLD, rCP01850 e rCP09720 quando utilizadas em ELISAs para detecção de soros positivos de ovinos apresentaram bons resultados que variaram de 90 % a 97,5 % de sensibilidade e 72 % a 92 % de especificidade,

demonstrando o potencial da utilização de proteínas recombinantes para o diagnóstico da doença (Silva et al., 2018).

2.7 Tratamento, Controle e Profilaxia

Apesar de ser sensível a diversos antimicrobianos *in vitro*, *C. pseudotuberculosis* permanece geralmente protegido no interior de piogranulomas no hospedeiro. Estes abscessos são revestidos por material caseoso o que dificulta ou até mesmo impede a ação desses medicamentos no patógeno intracelular (Dorella et al., 2006; Baird & Fontaine, 2007; de Sá Guimarães et al., 2011).

Com isso, uma alternativa é a drenagem dos abscessos ou de linfonodos superficiais acometidos, além da limpeza destes com iodo 10 % e cauterização química (Nozaki et al., 2000). Ademais, com a finalidade de evitar a contaminação do ambiente todos os instrumentos utilizados devem ser devidamente desinfetados, bem como plásticos e papéis usados para cobrir a área, devem ser devidamente incinerados e enterrados (de Sá Guimarães et al., 2011).

Levando em consideração a limitação desse tratamento na presença de abscessos internos, os quais apresentam maior dificuldade de identificação e impossibilidade de extirpação, as despesas incorridas no tratamento de infecções resistentes a antibióticos e os custos associados ao emprego destes antimicrobianos ineficazes, a falta de testes de diagnósticos que possibilitem a identificação do patógeno no rebanho de forma eficaz e medidas profiláticas, como a vacinação apresentam-se como alternativas mais viáveis e benéficas para o controle da doença. (de Sá Guimarães et al., 2011; Dorella et al., 2006; Droppa-Almeida et al., 2018).

2.8 Vacinas comerciais e experimentais

Tendo em vista as problemáticas de tratamento e diagnóstico da doença, formulações vacinais como meio profilático já circulam no mercado (De Sá Guimarães et al., 2011; Pinho et al., 2021; Scholl et al., 2023). Dentre as vacinas comerciais já disponíveis, destacam-se a (i) Caseous D-T® (Colorado SerumCo.,USA) que utiliza de toxóides polivalentes formulados com a proteína PLD inativada de *C.*

pseudotuberculosis em associação com diferentes antígenos de outros microrganismos como *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium novyi*, *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum* (Dorella et al., 2006), (ii) a Glanvac® (Vetrepharm Inc, Inglaterra) que foi a primeira vacina disponibilizada em 1984 e é formulada com a PLD inativada com formalina juntamente com adjuvante incompleto de Freund, ou ainda a (iii) Biodectin® (Fort Dodge LTD, Austrália) baseada na combinação fixa de 4 toxóides e duas culturas bacterianas tratadas com formalina e um endectocida (moxidectina) (Dorella et al., 2009; Pinho et al., 2021). Contudo, a eficácia dessas vacinas é variada e os animais ainda podem desenvolver abscessos superficiais e profundos ainda que imunizados (Costa et al., 2011; Williamson, 2001).

Outras vacinas disponíveis contam com diferentes abordagens e formulações como a utilização do patógeno atenuado. A cepa atenuada 1002 de *C. pseudotuberculosis*, isolada em 1971 de uma cabra, é utilizada em duas formulações: a vacina desenvolvida no Brasil pela Companhia Baiana de Desenvolvimento Agropecuário e liberada pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento do Brasil para produção no ano de 2000 e a LinfoVac® (Laboratórios Vencofarma do Brasil Ltda, Brasil) também liberada no Brasil para uso em ovinos e caprinos (Dorella et al., 2009; Bastos, 2012; Pinho et al., 2021). Contudo, essas vacinas comerciais ainda não conferem a proteção desejada, pois apresentam níveis de proteção variados ou insuficientes, além disso, algumas vacinas produzidas para ovinos não podem ser aplicadas em caprinos e várias formulações ocasionam reações adversas como febre, letargia e abscessos no local de inoculação (Ribeiro et al., 2014; Pinho et al., 2021).

A partir disto, devido a essa necessidade de novas abordagens para o controle da disseminação da doença estudos envolvendo a tecnologia de DNA recombinante na vacinologia ganham espaço utilizando epítomos específicos para gerar uma determinada resposta imune, buscando reprodutibilidade e segurança (Moyle & Toth, 2013; (de Pinho et al., 2021). Diferentes alvos antigênicos já foram avaliados, como uma formulação contendo a proteína PLD (Fontaine et al., 2006) recombinante associada a uma bacterina feita a partir de uma cepa de *C. pseudotuberculosis* que gerou de proteção contra o desafio. Outro estudo utilizando uma proteína de importância relevante para o patógeno, previamente identificada como CP40 na sua forma recombinante, induziu a produção de imunoglobulinas e apresentou taxas de proteção entre 90-100 % (Silva et al., 2014; Droppa-Almeida et al., 2016).

Ademais, com o uso da tecnologia de vacinologia reversa, novos alvos antigênicos podem ser preditos e estudados, como no estudo realizado por Rezende e colaboradores em 2016 buscando avaliar através da análise MED (Densidade de Epítopos Maduros) possíveis alvos vacinais ou para diagnóstico de LC. Neste estudo, dentre os 2.097 alvos gerados, os que foram ranqueados como mais promissores foram utilizados em ambas as abordagens (vacinal e diagnóstico), sendo um destes o gene Cp1002_0369 (posteriormente denominado Cp1002_RS01850). A proteína recombinante CP01850, quando presente em uma formulação com o adjuvante saponina apresentou uma taxa de proteção de 60 % após o desafio com a cepa virulenta (Bezerra et al., 2021; Rezende et al., 2016).

Outros exemplos de formulações vacinais contendo proteínas recombinantes podem ser citados, como: a utilização da proteína rHsp60 adjuvada com adjuvante completo de Freund induziu produção de IgG anti- rHsp60 em camundongos, bem com a produção de interferon gama, contudo não protegeu os animais contra o desafio (Pinho et al., 2009). A proteína recombinante CP09720 associada a hidróxido de alumínio produziu resposta humoral, porém sua taxa de proteção foi de 58.3 % em camundongos (Brum et al., 2017). Já em uma abordagem utilizando *M. bovis* BCG expressando a proteína PLD a proteção foi de 88 % dos camundongos desafiados e ainda demonstrou níveis mais altos de produção de IFN- γ (Leal et al., 2018).

As vacinas de subunidade também podem ser formuladas com estes antígenos selecionados em associação, na tentativa de melhorar as taxas de proteção obtidas para as proteínas individualmente (Duarte et al., 2016). Quando utilizadas em associação, as proteínas rPLD e rCP01850 adjuvadas com saponina protegeram 50 % dos camundongos, enquanto a formulação contendo apenas rPLD com o mesmo adjuvante obteve uma taxa de 30 % de proteção (Silva et al., 2018). Seguindo a mesma abordagem, rCP40 associada com rPLD demonstrou uma proteção de 42,86 % dos animais, e essas proteínas fusionadas com MDB (proteína ligante de maltose) atingiram uma taxa de 57,14 % (Barral et al., 2022). Com isso, é possível inferir a importância destes alvos selecionados no desenvolvimento de potenciais vacinas para linfadenite caseosa.

2.9 PLD, CP01850 e CP40

Considerada a principal exotoxina e possivelmente o principal fator de virulência de *C. pseudotuberculosis*, a fosfolipase D (PLD) está envolvida na disseminação do patógeno pelo hospedeiro pois hidrolisa as ligações éster da esfingomielina em membranas celulares de mamíferos (Soucek et al., 1971; Dorella et al., 2006). Ademais, impede a entrada de Ca^{2+} nas células T e diminui a produção de interleucina 2 (IL-2) (Pinho et al., 2021). Mesmo com a utilização de antitoxinas, o patógeno ainda pode promover o desenvolvimento de abscessos, e danos causados pela proteína em macrófagos de ovinos e caprinos também já foram relatados (Dorella et al., 2006). Por se tratar de um importante fator de virulência, a PLD já foi mencionada em diversos estudos, principalmente para avaliação de vacinas. Uma formulação vacinal para ovinos com uma cepa de *C. pseudotuberculosis* a qual teve gene que codifica para PLD deletado através de mutagênese sítio-específica foi capaz de proteger 44 % dos animais contra o patógeno (Hodgson et al., 1992). Além disso, grande parte das vacinas comerciais para linfadenite caseosa atualmente utilizam esta proteína como base em diferentes abordagens (Pinho et al., 2021). Como mencionado anteriormente, PLD na sua forma recombinante e purificada já demonstrou bons resultados em ensaios de imunização, seja na forma de bacterina (Pinho et al., 2021), individualmente adjuvada com saponina ou ainda em associação com a proteína rCP01850 (Silva et al., 2018).

Através da análise MED (Densidade de Epítomos Maduros) foi possível identificar a proteína CP01850 como um bom alvo antigênico (Rezende et al., 2016). Essa fosfatase ácida já foi analisada em imunodiagnóstico obtendo altos níveis de sensibilidade (90 %) e especificidade (92,5 %) e ainda em formulações vacinais, contudo sua utilização individualmente não foi eficiente para proteger os animais contra o desafio quando adjuvada com hidróxido de alumínio, já quando a formulação foi adjuvada com o extrato hidroalcolico de própolis vermelha brasileira a taxa de proteção foi de 70 % e com o adjuvante saponina foi de 60 % (Rezende et al., 2020; Bezerra et al., 2020; Bezerra et al., 2021).

Descrito por Walker e colaboradores em 1994, a endoglicosidase CP40 foi identificada no sobrenadante de cultivos de *C. pseudotuberculosis* ademais, ovinos vacinados com a proteína semi-purificada adjuvada com hidróxido de alumínio

apresentaram uma redução de 82 % no número de infectados quando comparados ao grupo controle, fato semelhante aos resultados da proteína PLD (Bastos, 2012). Sua avaliação como possível vacina também já foi realizada com algumas abordagens diferentes. A CP40 recombinante foi testada com os adjuvantes saponina e adjuvante completo de Freund e ambos apresentaram 100 % de proteção contra o desafio (Droppa-Almeida et al., 2016). Como mencionado anteriormente, essa proteína também foi fusionada a MDB (proteína ligante de maltose) e PLD e obteve uma proteção de 57,14 % e quando associada a cepa mutada CP09 de *C. pseudotuberculosis* essa proteção chegou a 70 % (Barral et al., 2022; Silva et al., 2014). Tendo em vista a importância dessas proteínas e as diversas estratégias vacinais que podem ser avaliadas, a associação de antígenos possivelmente poderia induzir uma resposta imune efetiva.

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

A associação das proteínas rPLD, rCP01850 e rCP40 de *C. pseudotuberculosis* induz resposta imune humoral e protege camundongos Balb/c contra linfadenite caseosa.

3.2 Objetivo Geral

Avaliar as proteínas recombinantes fosfolipase D (rPLD), rCP01850 e rCP40 de *C. pseudotuberculosis* em associação como vacina de subunidade recombinante para o controle da linfadenite caseosa.

3.3 Objetivos Específicos

- Expressar e purificar as proteínas rPLD (pAE/pld), rCP01850 (pAE/01850) e rCP40 (pAE/cp40) em *Escherichia coli*;
- Produzir uma vacina de subunidade utilizando as proteínas rPLD, rCP01850 e rCP40 em associação ou individualmente adjuvadas com hidróxido de alumínio;
- Imunizar camundongos Balb/c com as diferentes formulações vacinais;
- Avaliar a proteção conferidas pelas formulações vacinais frente ao desafio com a cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis* em camundongos;
- Avaliar a resposta imune humoral induzida pelas vacinas de subunidade.

4 CAPÍTULOS

4.1 Relatório de Atividades

4.1.1 Material e Métodos

4.1.1.1 Locais dos experimentos

Todos os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária (LBIP), pertencente ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e no Biotério Central da UFPel.

4.1.1.2 Cepas e condições de cultivo

Para este estudo foi utilizada a cepa patogênica de *C. pseudotuberculosis* MIC-6, a qual foi cultivada em Brain and Heart Infusion Broth (Caldo BHI) ou BHI-Ágar por 48 h a 37 °C sob agitação em shaker. Em adição, também foram utilizadas as cepas de *E. coli* TOP10 e BL21 Star (DE3) para propagação de plasmídeos e expressão das proteínas, respectivamente. Para isso, as cepas foram cultivadas em caldo Luria Bertani (LB) ou LB contendo 1,5% de ágar bacteriológico por 16 h a 37 °C, quando necessário foi adicionado antibiótico ampicilina (100 mg/mL) ao meio de cultivo.

4.1.1.3 Expressão e purificação das proteínas rPLD, rCP01850 e rCP40

Os vetores pAE/pld, pAE/CP01850 e pAE/cp40, previamente construídos (Rezende et al., 2016; Silva et al., 2018; Droppa-Almeida et al., 2016). foram utilizados para transformar a cepa de *E. coli* BL21 Star (DE3) por eletroporação. Estas células foram encubadas em 500 µL de caldo LB e sob agitação por 1 h e 30 min a 37 °C. Após esse processo, as células foram plaqueadas em meio LB-Ágar com ampicilina e as placas foram incubadas por 16 h a 37 °C.

Para os pré-inóculos uma colônia isolada de cada proteína foi selecionada e adicionada em 50 mL de caldo LB com ampicilina sob agitação por 16 h a 37 °C. Estes pré-inóculos foram vertidos em 500 mL de caldo LB acrescido de ampicilina e mantido em agitação (37 °C) até atingirem uma densidade óptica ($D.O_{600}$) entre 0.6 e 0.8. A indução dos cultivos foi realizada através da adição de 1 mM de Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e estes foram deixados sob agitação por 3 h a 37 °C. Então, os cultivos foram centrifugados a 7.000 rpm por 15 min a 4 °C e o *pellets* ressuspensos em PBS 1x estéril. Foi então adicionado aos *pellets* 100 mg/mL de lisozima, sonificados e mantidos sob agitação em câmara fria por 30 min a 4 °C. Foi realizada mais uma centrifugação 7.000 rpm por 15 min a 4 °C e os *pellets* foram ressuspensos com Akta Wash com Ureia 8 M e mantidos sob agitação por 16 h a 4 °C. Foi realizada outra centrifugação desta vez a 10.000 rpm por 40 min e os sobrenadantes foram filtrados para posterior purificação.

As purificações foram realizadas por cromatografia de afinidade em coluna de sepharose HisTrap Sepharose (GE) carregada com níquel e prosseguiu-se com a eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12 %. As proteínas foram dialisadas utilizando tampão Tris NaCl com Ureia 7 M, e então concentradas em PEG 7000 e por fim foram quantificadas por meio do kit BCA Protein Assay (Pierce).

4.1.1.4 Western blot

Para confirmação da identidade das proteínas rPLD, rCP01850 e rCP40, foram fervidos 40 μ L de cada proteína purificada juntamente com 10 μ L de tampão SDS-PAGE 5x por 10 min a 100 °C. Com as amostras foi realizado SDS-PAGE 12% e estas foram transferidas para uma Nitrocellulose Blotting Membrane (GE). A membrana então foi bloqueada com PBS-T (PBS 1x pH=7,4; 0,05% Tween 20) acrescida de 5 % de leite em pó por 16 h a 4 °C e lavada três vezes com PBS-T com intervalos de agitação de 1 min entre as lavagens. Foi adicionado à membrana o anticorpo monoclonal anti-6x-His conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição 1:5000 e deixado sob agitação por 1 h. Para a etapa de revelação a membrana foi lavada cinco vezes com PBS-T com intervalos de agitação de 1 min e então foi adicionada a

solução reveladora à base de diaminobendizina (DAB), sulfato de níquel 0,3 %, tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,6) e H₂O₂.

4.1.1.5 Ensaio de imunização

A estratégia vacinal que foi empregada neste estudo, consiste na utilização das proteínas recombinantes PLD, CP01850 e CP40 de forma individual e em associação. Para isso, foram utilizados 5 grupos compostos por 10 camundongos Balb/c fêmeas, entre 6-8 semanas de idade, mantidas sob condições de temperatura e umidade adequadas, ciclos de 12 h de claro e escuro e água e comida *ad libitum*. Estes animais foram imunizados por via subcutânea com 2 doses em um intervalo de 21 dias. As imunizações foram realizadas com formulações contendo 50 µg de proteína (CP01850, CP40 e PLD) por dose de vacina, ou 16,6 µg de cada proteína quando usadas em associação. Todas as formulações utilizaram hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) a 15 % como adjuvante e totalizaram um volume final de 200 µL.

Os grupos foram: G1, inoculado apenas com solução salina 0,9% (controle negativo); G2, inoculado com rPLD associada ao Al(OH)₃; G3, rCP01850 inoculado com associado ao Al(OH)₃; G4, inoculado com rCP40 associado ao Al(OH)₃ e G5, inoculado com a combinação de rPLD, rCP01850 e rCP40 associado ao Al(OH)₃.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (protocolo número 12522-2019) de acordo com as normas propostas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.1.1.6 Determinação da dose letal 50 (DL50) e ensaio de desafio

Para imunização e desafio, foi utilizada a cepa patogênica MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*, sendo necessário estabelecer a dose mínima necessária para indução da infecção letal, bem como manifestações clínicas em 50% dos animais (DL50). O cálculo da dose letal foi realizado seguindo o protocolo de diluição seriada

descrito por Simmons e colaboradores em 1997. Grupos contendo quatro fêmeas de camundongos Balb/c foram infectadas intraperitonealmente com doses seriadas variando de 10^5 a 10^2 unidades formadoras de colônia (UFC). Sendo assim. A diluição que levou 50 % dos camundongos a óbito foi definida como a DL50 (REED; MUENCH, 1938).

Os animais foram desafiados 21 dias após a 2ª dose da vacina. O desafio foi realizado utilizando duas vezes a DL50 da cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis* por via intraperitoneal. Os animais foram observados e avaliados por 40 dias seguindo os critérios de *endpoint* descritos por Silva e colaboradores em 2019, sendo estes referentes à perda de peso, pelo, formação de abscessos e letargia (Silva et al., 2019).

4.1.1.7 Avaliação da resposta imune humoral

Visando a avaliação da resposta humoral induzida pelas vacinas, coletas de sangue foram realizadas nos dias 0, 21 e 42 do experimento de imunização e desafio. As amostras foram centrifugadas para obtenção dos soros que foram armazenados (-20 °C) até sua utilização para dosagem dos anticorpos IgG Total, IgG1 e IgG2a por ELISA indireto. O ensaio foi realizado utilizando os mesmos grupos do teste desafio.

Para isso, placas com 96 cavidades de fundo chato (Maxisorp-Nunc) foram sensibilizadas com 100 ng/cavidade de uma proteína purificada ou do pool contendo as três proteínas (de acordo com o grupo) em 100 µL de tampão carbonato bicarbonato pH 9,8 e incubadas a 4 °C por 16 h. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T (PBS 1X pH 7.4; 0,05% de Tween 20) e bloqueadas com 200 µL/cavidade de leite em pó desnatado 5 % diluído em PBS-T por 2 h à 37 °C. Em seguida, as placas foram lavadas novamente três vezes e foi adicionado 100 µL/cavidade das amostras de soro de camundongos na diluição de 1:50, em duplicata. Após 1 h de incubação à 37 °C e mais três lavagens com PBS-T, 100 µL/cavidade do anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição de 1:5000 foi adicionado para avaliação de IgG total. Realizada mais uma incubação de 1 h a 37 °C e três lavagens com PBS-T, foi então adicionado 100 µL/cavidade de solução reveladora (200 moles ortofenilenodiamina [OPD, Sigma] diluída em 10 mL de tampão citrato-

fosfato pH 7,6 e 50 µL de H₂O₂). A absorbância foi aferida a 492 nm a partir de um leitor de placas de ELISA (Mindray) (Silva et al., 2020).

Nas placas referentes à análise de IgG1 e IgG2a após a etapa de bloqueio foram adicionados 100 µl/cavidade dos anticorpos de camundongo produzido em cabra, sendo anti-IgG1 na diluição 1:5000 e anti-IgG2a na diluição 1:2000. Foram realizadas três lavagens com PBS-T, e então adicionados 100 µl/cavidade de anti-anticorpo de cabra conjugado com peroxidase na diluição de 1:5000, e incubado por 1 h a 37 °C. Ao final, foram realizadas cinco lavagens com PBS-T, seguidas das etapas de revelação e posteriormente a leitura dos resultados.

4.1.1.8 Análises estatísticas

Para determinar diferenças significativas entre as taxas de mortalidade e sobrevivência dos grupos controle e imunizados foram utilizados o teste exato de Fisher e teste log-rank ($p < 0,05$), respectivamente.

Os dados foram analisados usando GraphPad Prism versão 8.0 para Windows e expressos como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças nos níveis de produção de imunoglobulinas foram calculadas usando uma análise de variância unilateral (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Tukey. Diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

4.1.2 Resultados

4.1.2.1 Expressão, purificação e confirmação de identidade das proteínas

Para expressão foi utilizada a cepa *E. coli* BL21 Star (DE3) para as três proteínas, as quais também foram solubilizadas em Ureia 8M (Figura 1A). Os rendimentos obtidos foram 12 mg/mL, 22.5 mg/mL e 13 mg/mL para rPLD, rCP01850 e rCP40, respectivamente. A confirmação de identidade das proteínas se deu através

de *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-6x His tag (Sigma Aldrich). As bandas reativas correspondentes as proteínas apresentaram os tamanhos esperados de 31 kDa para rPLD, 33.5 kDa para rCP01850 e 40 kDa para rCP40 (Figura 1B).

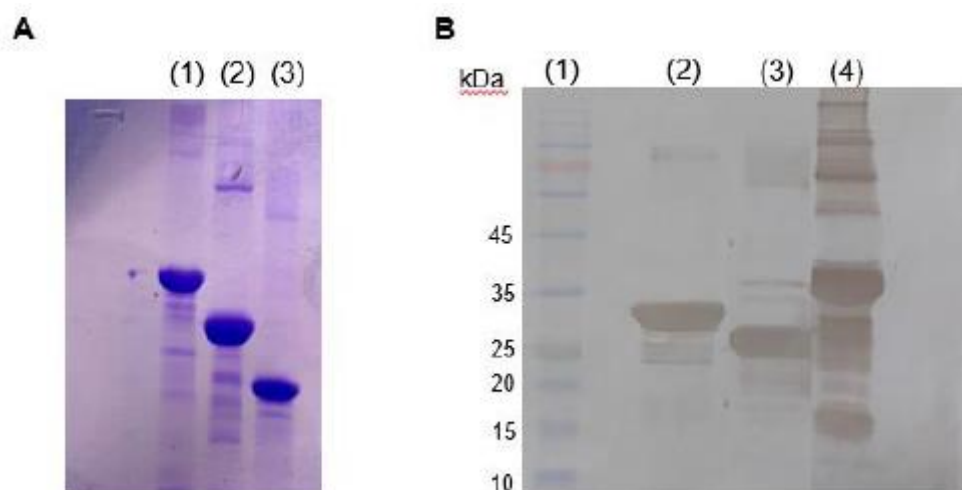


Figura 1. (A) Avaliação da expressão e purificação das proteínas recombinantes. (1) rCP40; (2) rCP01850 e (3) rPLD, todas purificadas. (B) Caracterização da identidade das proteínas recombinantes através de Western blot utilizando anticorpo monoclonal anti-6x His tag. (1) Marcador de peso molecular pré-corado; (2) rCP01850; (3) rPLD; (4) rCP40, purificadas.

4.1.2.2 Avaliação da proteção vacinal após o desafio

As taxas de sobrevivência frente ao desafio com a cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis* são apresentadas na Figura 2. O grupo G5 (rPLD + rCP01850 + rCP40 + Al(OH)₃) foi o único grupo que apresentou 100% de sobrevivência após 40 dias do desafio. Os grupos G2 (rPLD + Al(OH)₃) e G4 (rCP40 + Al(OH)₃) apresentaram uma taxa de 80 % de sobrevivência considerada significativa em relação ao G1, enquanto o grupo G3 (rCP01850 + Al(OH)₃) apresentou 30% de sobrevivência dos animais, não diferindo estatisticamente do G1, no qual todos os animais entraram em *endpoint*.

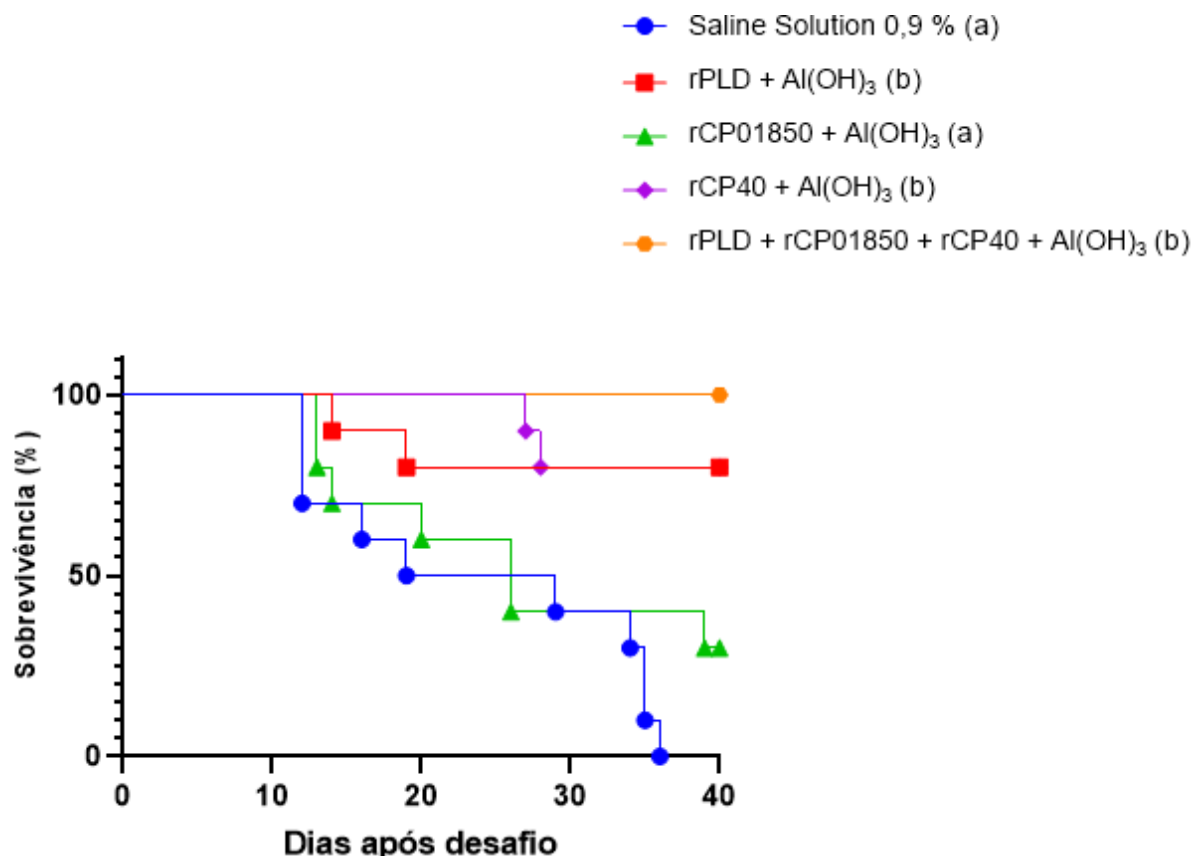
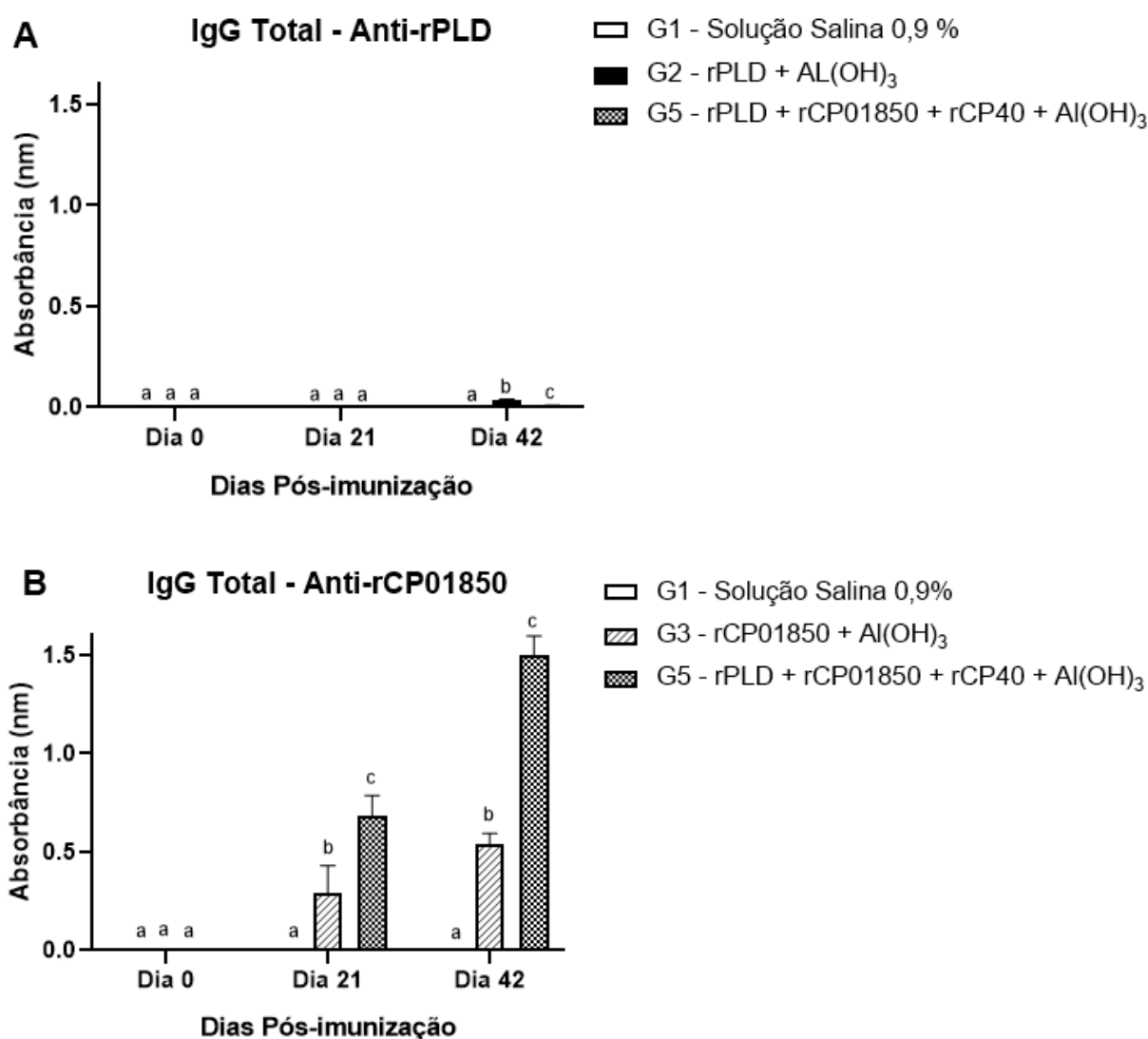


Figura 2. Sobrevivência de camundongos Balb/c imunizados com as proteínas rPLD, rCP01850 e rCP40 após desafio virulento com *C. pseudotuberculosis*. Foram utilizados dez camundongos em cada grupo e os animais foram observados por 40 dias. As curvas de sobrevivência foram comparadas usando análise de Log-rank e teste exato de Fisher ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos.

4.1.2.3 Avaliação da resposta imune humoral

A determinação dos níveis de IgG total, IgG1 e IgG2a produzidos contra as proteínas recombinantes individualmente ou em associação se deu através de teste ELISA indireto e os resultados estão demonstrados nas figuras 3, 4 e 5. Quando avaliada a produção de IgG total, pode-se observar que os grupos G3 (rCP01850 + Al(OH)₃) e G4 (G4 - rCP40 + Al(OH)₃), ambos contendo proteínas individualmente elicitarão a produção de imunoglobulinas nos dias 21 e ainda tiveram um aumento no dia 42 em comparação ao controle G1 (Solução Salina 0,9 %) (Figura 3). A proteína rCP01850 elicitou maiores níveis de IgG total tanto no grupo individual G3 (rCP01850 + Al(OH)₃) quanto no grupo associado G5 (rPLD + rCP01850 + rCP40 + Al(OH)₃) e esse padrão se manteve nos dias 21 e 42 (Figura 3), além disto o grupo da associação

induziu níveis mais elevados do que a proteína sozinha. A proteína rPLD não influenciou significativamente ($p < 0,05$) na produção de IgG total pelo grupo associado, apenas pelo grupo individual G2 (rPLD + $\text{Al}(\text{OH})_3$) no dia 42. Destaca-se o grupo G5 (rPLD + rCP01850 + rCP40 + $\text{Al}(\text{OH})_3$) que proporcionou um aumento na produção de IgG total contra a proteína rCP01850 nos dias 21 e 42 quando comparado ao grupo G3 (rCP01850 + $\text{Al}(\text{OH})_3$).



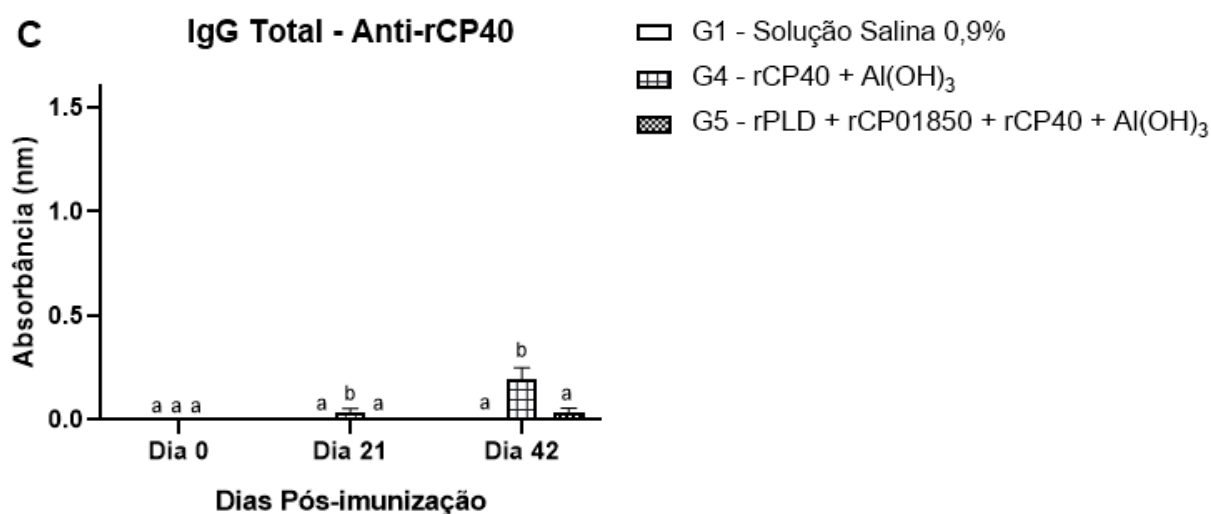


Figura 3. Determinação dos níveis de IgG total, através de ELISA indireto contra as proteínas rPLD (A), rCP01850 (B) e rCP40 (C) em camundongos imunizados com diferentes formulações contendo as proteínas recombinantes. As amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 21 e 42 do experimento. Os testes foram realizados em cada grupo com 10 animais e os resultados estão apresentados como média (colunas) e desvio padrão (barras) de absorbâncias (nm).

A avaliação de isotipos IgG1 e IgG2a também se deu através de ELISA (anti-rPLD, anti-rCP01850 e anti-rCP40) e a apresentou uma produção dessas imunoglobulinas mais baixa em relação ao IgG total como o esperado sabendo-se que são isotipos. As proteínas rCP01850 e rCP40 induziram os maiores níveis de produção de IgG1 e IgG2a pelos grupos G3 (rCP01850 + Al(OH)₃), G4 (G4 - rCP40 + Al(OH)₃) e G5 (rPLD + rCP01850 + rCP40 + Al(OH)₃) (Figuras 4 e 5). Não foi constatada diferença estatística ($p < 0,05$) entre a produção de IgG1 e IgG2a pelos grupos G3 (rCP01850 + Al(OH)₃) e G5 (rPLD + rCP01850 + rCP40 + Al(OH)₃). A proteína rPLD novamente influenciou apenas os níveis dos isotipos do grupo individual G2 (rPLD + Al(OH)₃).

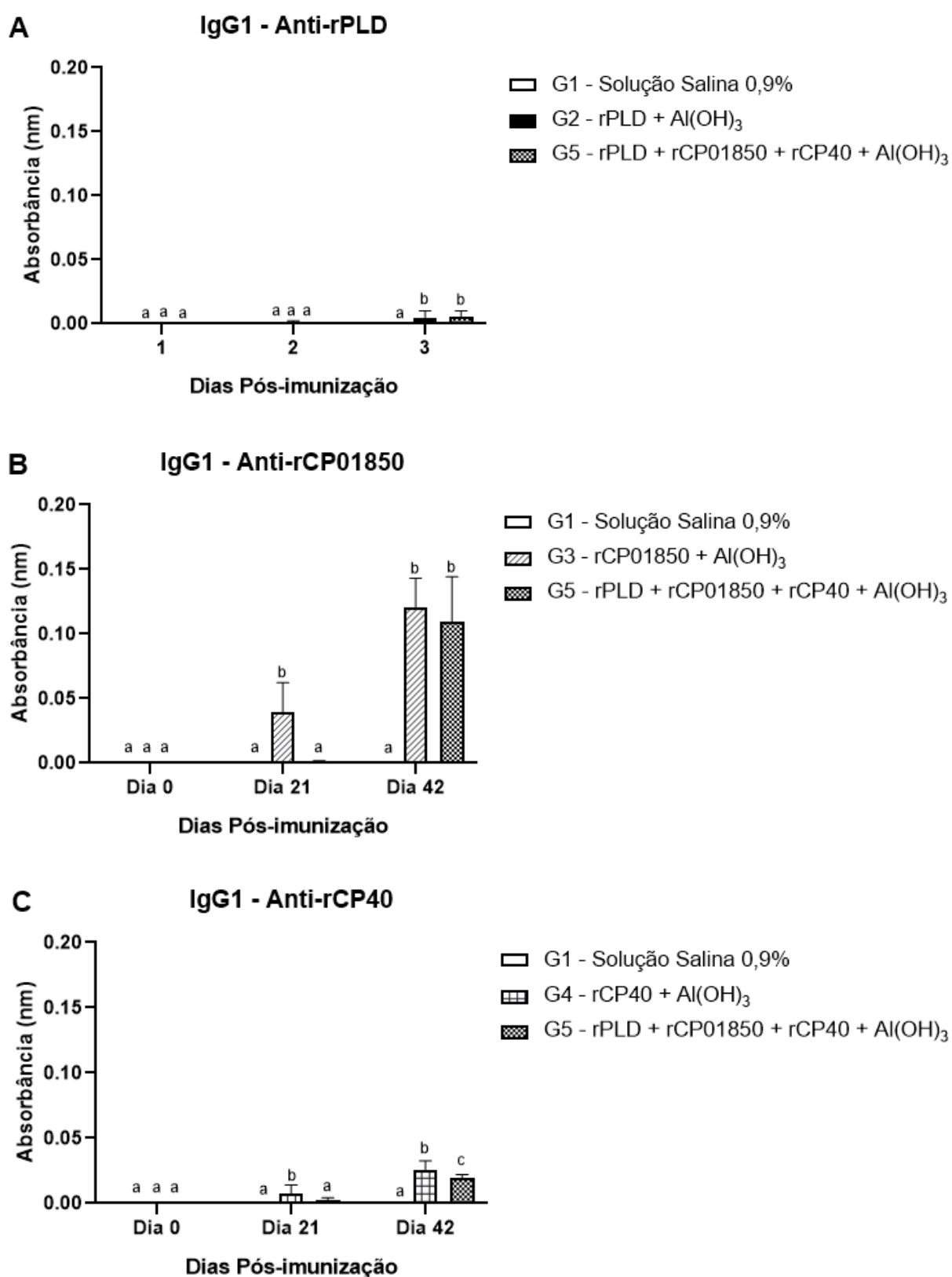
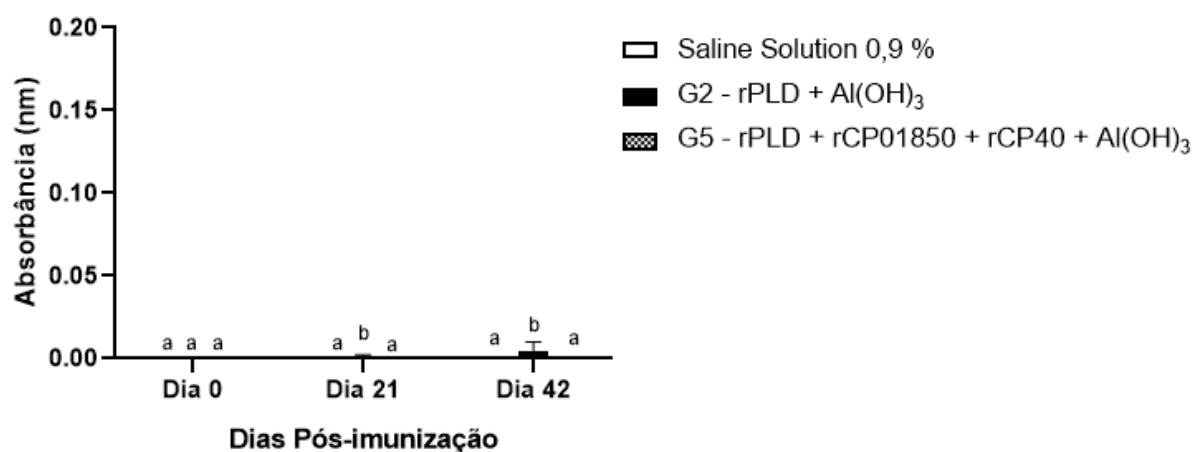


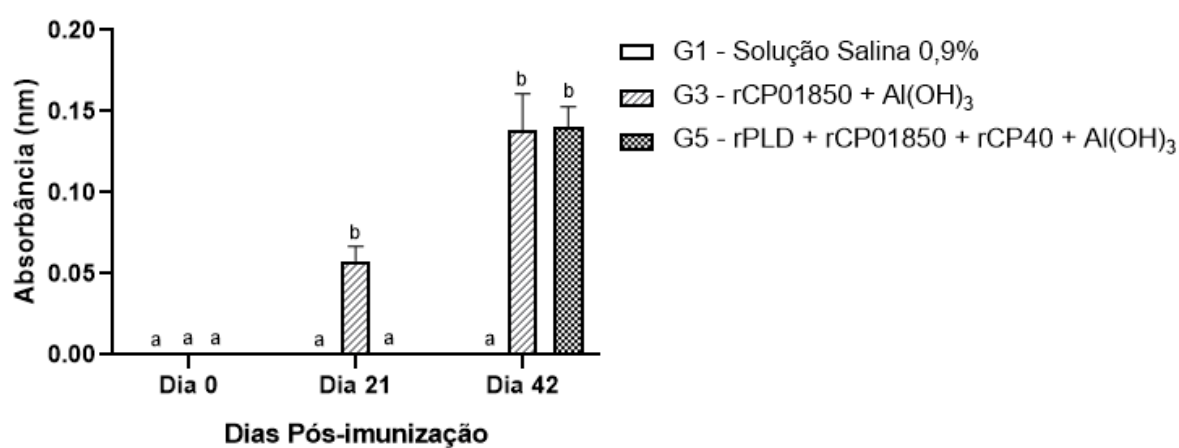
Figura 4. Determinação dos níveis de IgG 1, através de ELISA indireto contra as proteínas rPLD (A), rCP01850 (B) e rCP40 (C) em camundongos imunizados com diferentes formulações contendo as proteínas recombinantes. As amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 21 e 42 do experimento.

Os testes foram realizados em cada grupo com 10 animais e os resultados estão apresentados como média (colunas) e desvio padrão (barras) de absorbâncias (nm).

A IgG2a - Anti-rPLD



B IgG2a - Anti-rCP01850



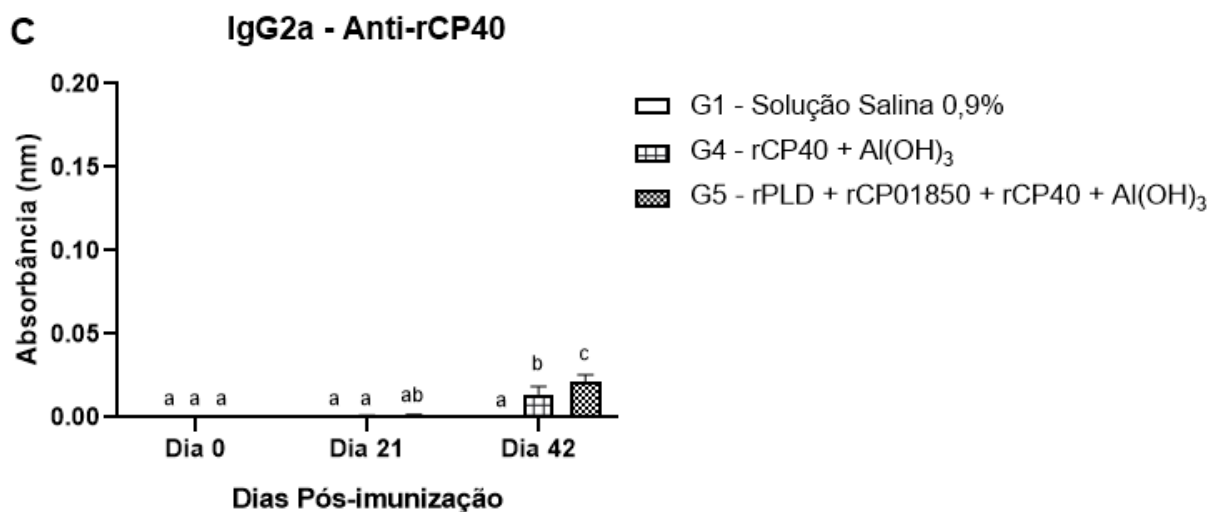


Figura 5. Determinação dos níveis de IgG 2a, através de ELISA indireto contra as proteínas rPLD (A), rCP01850 (B) e rCP40 (C) em camundongos imunizados com diferentes formulações contendo as proteínas recombinantes. As amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 21 e 42 do experimento. Os testes foram realizados em cada grupo com 10 animais e os resultados estão apresentados como média (colunas) e desvio padrão (barras) de absorbâncias (nm).

5 DISCUSSÃO GERAL

As vacinas comerciais disponíveis na atualidade não conferem proteção significativa para a LC, fazendo-se necessário a busca por novas estratégias e alvos vacinais (Windsor, 2011). Nesse sentido, vacinas recombinantes, por serem baseadas em alvos selecionados podem influenciar melhor a resposta imune a deixando mais direcionada e ainda, por não apresentarem toxóides ou o agente etiológico da doença em suas formulações, se tornam mais seguras (Droppa-Almeida et al., 2016). Neste estudo foi avaliada a associação de três proteínas recombinantes rPLD, rCP01850 e rCP40 de *C. pseudotuberculosis* como formulação vacinal e a resposta humoral induzida por estas proteínas em modelo murino. De acordo com a literatura, as três proteínas já apresentaram resultados promissores de proteção e indução da reposta imune quando utilizadas separadamente em vacinas (Pinho et al., 2021; Rezende et al., 2020; Droppa-Almeida et al., 2016).

O estudo demonstrou que o grupo G5 (rPLD + rCP01850 + rCP40 + Al(OH)₃) obteve uma taxa de proteção de 100 % contra o desafio com a cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*, enquanto os grupos individuais G2 (rPLD + Al(OH)₃), G3 (rCP01850 + Al(OH)₃) e G4 (rCP40 + Al(OH)₃) geraram taxas de proteção de 80 %, 30 % e 80 %, respectivamente. A proteína rPLD já foi avaliada em formulação vacinal por Silva e colaboradores (2017) e Pinho e colaboradores (2021) e obteve em ambos os estudos um nível de proteção de 30 %, contudo suas formulações eram adjuvadas com saponina enquanto no presente estudo o adjuvante utilizado foi hidróxido de alumínio. A utilização do hidróxido de alumínio ou adjuvantes contendo alumínio em sua composição é amplamente empregada em diferentes estratégias vacinais, principalmente com antígenos purificados, uma vez que estes são pouco imunogênicos e necessitam de adjuvantes para impulsionar a indução da resposta imune (HogenEsch et al., 2018). Ademais, derivados de alumínio já se demonstraram eficazes em conjunto com diversos antígenos vacinais em formulações licenciadas, além de apresentarem baixo custo, segurança, reatogenicidade mínima e ainda estimularem a produção de ambas as respostas imunes: Th1 e Th2 (HogenEsch et al., 2018; He et al., 2015).

A proteína rCP01850 foi avaliada adjuvada com saponina e com o adjuvante contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha brasileira e as taxas foram de 60 % e 70 % de proteção foram obtidas, respectivamente (Bezerra et al., 2021; Bezerra et al., 2020). Droppa-Almeida e colaboradores (2016) realizaram um estudo avaliando a ação da proteína rCP40 frente ao desafio com cepa virulenta a qual gerou proteção de 100 % em camundongos em grupos com diferentes adjuvantes (Adjuvante Completo de Freund e saponina) porém, nem todos os animais do grupo controle vieram a óbito.

A maioria dos estudos mencionados anteriormente utilizaram como adjuvante a saponina, contudo, uma decisão do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (Sindan) juntamente com o Ministério da Agricultura e Pecuária do Brasil de retirar este adjuvante da vacina da febre aftosa bovina devido aos altos números de animais com abscessos após a vacinação influenciou o presente estudo a avaliar outro adjuvante, o hidróxido de alumínio (Ministério da Agricultura e Pecuária, 2022). Este adjuvante está relacionado principalmente a indução na produção de anticorpos específicos o que é de grande importância na vacinação por ajudar a aumentar a reposta imune (Principi & Esposito, 2018). Levando em consideração que a LC é causada por um patógeno intracelular, a resposta imune mais recomendada seria a celular, entretanto a presença de anticorpos neutralizantes também é importante para o controle do antígeno (Bastos, 2012). Apesar disto, Rezende e colaboradores (2020) demonstraram que a utilização de hidróxido de alumínio juntamente com a proteína recombinante rCP01850 induziu uma reposta mista Th1/Th2 indicando tanto a produção de anticorpos quanto uma resposta celular, porém o grupo contendo a proteína purificada não conferiu proteção contra o desafio, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho.

Avaliando a resposta humoral obtida neste estudo, apesar de não ter conferido proteção significativa, o grupo G3 (rCP01850 + Al(OH)₃) apresentou elevada produção de IgG total, IgG1 e IgG2 quando comparado ao grupo controle e o grupo com as proteínas em associação (G5) nos dias 21 e 42. O grupo G2 (rPLD + Al(OH)₃) acabou induzindo uma baixa produção de anticorpos IgG total e seus isotipos, contrapondo sua boa taxa de proteção. Os animais do grupo G4 (rCP40 + Al(OH)₃), apresentou produção reduzida de IgG1 e IgG2a no dia 42. O grupo G5 apresentou bons níveis de produção de IgG total contra a proteína rCP01850 nos dias 21 e 42. Ademais, este

grupo ainda induziu a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a contra rCP40 em menor nível.

A produção de uma resposta imune humoral robusta é importante para o controle da disseminação do patógeno assim como para evitar a formação de granulomas (Bezerra et al., 2021). Porém um perfil imunológico baseado apenas na produção de anticorpos contra LC não é eficiente para proteção dos animais, é necessária uma indução da resposta celular do tipo Th1 que está diretamente relacionada a eliminação de patógenos intracelulares. Os linfócitos T-helper 1 regulam a imunidade celular e produzem interferon- γ (IFN γ), os linfócitos T-helper 2 estão envolvidos na imunidade humoral, produção de interleucinas, atuando na defesa contra patógenos extracelulares (Dong, 2006). Com isso, o sucesso de uma formulação vacinal para LC depende da indução de ambas respostas e estudos avaliando os efeitos benéficos desta resposta dupla já foram realizados com proteínas recombinantes e corroboram com a hipótese apresentada neste trabalho (Silva et al., 2020; Pinho et al., 2021; Rezende, et al., 2020; Bezerra et al., 2021).

Neste estudo, pode-se demonstrar que quando associadas as proteínas aumentaram a produção de anticorpos contra a proteína rCP01850, mas não tiveram diferença estatística significativa na produção de imunoglobulinas contra as outras duas proteínas. Sendo assim, não pode se relatar um efeito sinérgico dessas proteínas associadas, mas sim que pelo menos duas delas (rPLD e rCP40) agiram de maneira antagônica ou as disponibilidades destes antígenos ao sistema imune foram afetadas quando adjuvadas com hidróxido de alumínio, tendo em vista que as mesmas proteínas em formulações com outros adjuvantes apresentaram uma melhor indução da resposta humoral. Afinal, se é sabido que diferentes adjuvantes podem promover respostas diferentes mesmo que com o mesmo antígeno (Pinho et al., 2021; Droppa-Almeida et al., 2016). Finalmente, é importante ressaltar que o grupo de associação (G5) protegeu 100 % dos animais contra o desafio e a análise de resposta celular será realizada futuramente a fim de enriquecer os resultados obtidos no trabalho.

6 CONCLUSÃO

A formulação vacinal contendo a associação das proteínas rPLD, rCP01850 e rCP40 conferiu proteção de 100 % frente ao desafio com a cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*.

O grupo G5 (rPLD + rCP01850 + rCP40 + Al(OH)₃) induziu produção de anticorpos IgG total, IgG 1 e IgG2a contra essas proteínas, dando destaque para proteína rCP01850. Os promissores resultados de sobrevivência associados aos níveis de resposta imune humoral apontam para a indução de uma resposta imune celular e assim indicam os próximos passos a serem seguidos na avaliação da formulação proposta por esse trabalho.

7 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S., SOUSA, C., ABREU, V., DINIZ, C., DORNELES, E.M.S., LAGE, A.P., BARH, D. & AZEVEDO, V. (2017). Exploration of Nitrate Reductase Metabolic Pathway in *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *International Journal of Genomics*. 2017.
- ALVES, J.R.A., DE FARIAS, A.E.M., SILVA, J.D. DA, VIANA, M.P., LIMA, A.M.C., FACCIOLI-MARTINS, P.Y., PINHEIRO, R.R., ALVES, F.S.F., DE AZEVEDO, S.S. & ALVES, C.J. (2020). Factors associated with the seroprevalence of caseous lymphadenitis in sheep from Northeastern Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*. 182.
- BAIRD, G. (2000). Severe ringworm lesions in a Suffolk ram Differential diagnosis of non-parasmitic skin conditions in sheep. *In Practice*. 22. p. 72–79. Available at: <http://inpractice.bmj.com/>.
- BAIRD, G.J. & FONTAINE, M.C. (2007). *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. *Journal of Comparative Pathology*. 137(4). p. 179–210.
- BARNABÉ, N.N., ALVES, J.R.A., DE FARIAS, A.E.M., ALVES, F.S.F., FACCIOLI-MARTINS, P.Y., PINHEIRO, R.R., DE AZEVEDO, S.S. & ALVES, C.J. (2020). Assessment of caseous lymphadenitis in goats in a slaughterhouse in the Brazilian semi-arid region and estimates of economic losses due to carcass condemnation. *Semina:Ciencias Agrarias*. 41(6). p. 2655–2668.
- BARRAL, T.D., KALIL, M.A., MARIUTTI, R.B., ARNI, R.K., GISMENE, C., SOUSA, F.S., COLLARES, T., SEIXAS, F.K., BORSUK, S., ESTRELA-LIMA, A., AZEVEDO, V., MEYER, R. & PORTELA, R.W. (2022a). Immunoprophylactic properties of the *Corynebacterium pseudotuberculosis*-derived MBP:PLD:CP40 fusion protein. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 106(24). p. 8035–8051.
- BARRAL, T.D., KALIL, M.A., MARIUTTI, R.B., ARNI, R.K., GISMENE, C., SOUSA, F.S., COLLARES, T., SEIXAS, F.K., BORSUK, S., ESTRELA-LIMA, A., AZEVEDO, V., MEYER, R. & PORTELA, R.W. (2022b). Immunoprophylactic properties of the *Corynebacterium pseudotuberculosis*-derived MBP:PLD:CP40 fusion protein. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 106(24). p. 8035–8051.

- BARROS DE PINHO, R., DE OLIVEIRA SILVA, M.T., BRENNER, G., DIÉ ALVES, M.S., AZEVEDO, V., DIAS PORTELA, R. & BORSUK, S. (2021). A novel approach for an immunogen against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection: An *Escherichia coli* bacterin expressing phospholipase D. *Microbial Pathogenesis*. 151.
- BEZERRA, F.S.B., SILVA, M.T. DE O., REZENDE, A. DE F.S., LOPES, A.S., DE PINHO, R.B., SEIXAS, F.K., COLLARES, T.V., PORTELA, R.W.D., AZEVEDO, V.A. DE C. & BORSUK, S. (2021). Saponin-adjuvanted recombinant vaccines containing rCP00660, rCP09720 or rCP01850 proteins against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *Vaccine*. 39(18). p. 2568–2574.
- BILLINGTON, S.J., ESMAY, P.A., SONGER, J.G. & JOST, B.H. (1988). *Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from Corynebacterium pseudotuberculosis*, Available at: www.fems-microbiology.org.
- BILLINGTON, S.J., ESMAY, P.A., SONGER, J.G. & JOST, B.H. (2002). Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*. 208(1). p. 41–45. Available at: www.fems-microbiology.org.
- BINNS, S.H., GREEN, L.E. & BAILEY, M. (2007). Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. *Veterinary Microbiology*. 123(1–3). p. 169–179.
- BRILHANTE BEZERRA, F.S., SILVA REZENDE, A. DE F., OLIVEIRA SILVA, M.T. DE, SENA-LOPES, Â., ROESCH-ELY, M., PÊGAS HENRIQUES, J.A., PADILHA, F.F., CARVALHO AZEVEDO, V.A., DIAS PORTELA, R.W., SEIXAS, F.K., COLLARES, T.V., SAVEGNAGO, L. & BORSUK, S. (2020). The combination of Brazilian red propolis and recombinant protein rCP01850 in the immunoprophylaxis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *Microbial Pathogenesis*. 149.
- BROWN, C.C., OLANDER, H.J. & ALVES, S.F. (1987). Synergistic Hemolysis-Inhibition Titers Associated with Caseous Lymphadenitis in a Slaughterhouse Survey of Goats and Sheep in Northeastern Brazil. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 51. p. 46–49.

- BRUM, A.A., REZENDE, A. DE F.S., BRILHANTE, F.S., COLLARES, T., BEGNINE, K., SEIXAS, F.K., COLLARES, T.V., DELLAGOSTIN, O.A., AZEVEDO, V., SANTOS, A., PORTELA, R.W. & BORSUK, S. (2017). Recombinant esterase from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit recombinant vaccines partially protects mice against challenge. *Journal of Medical Microbiology*. 66(5). p. 635–642.
- BURREL, D.H. (1980). A simplified double immunodiffusion technique for detection of *Corynebacterium ovis* antitoxin. *Research in Veterinary Science*. 28. p. 234–237.
- CAMERON, C.M., MINNAAR, J.L., ENGELBRECHT, M. & PURDOM, M.R. (1972). *IMMUNE RESPONSE OF MERINO SHEEP TO INACTIVATED CORYNEBACTERIUM PSEUDO TUBERCULOSIS VACCINE*,
- 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., MEYER, R., PORTELA, R.W., OLIVEIRA, S.C., MIYOSHI, A. & AZEVEDO, V. (2011). 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 Research Notes*. 4.
- DONG, C. (2006). Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nature Reviews Immunology*. 6(4). p. 329–334.
- DORELLA, F.A., PACHECO, L.G.C., SEYFFERT, N., PORTELA, R.W., MEYER, R., MIYOSHI, A. & AZEVEDO, V. (2009). Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. *Expert Review of Vaccines*. 8(2). p. 205–213.
- DORELLA, F.A., PACHECO, L.G.C., OLIVEIRA, S.C., MIYOSHI, A. & AZEVEDO, V. (2006a). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Veterinary Research*. 37(2). p. 201–218.
- DROPPA-ALMEIDA, D., VIVAS, W.L.P., SILVA, K.K.O., REZENDE, A.F.S., SIMIONATTO, S., MEYER, R., LIMA-VERDE, I.B., DELAGOSTIN, O., BORSUK, S. & PADILHA, F.F. (2016a). Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. *Vaccine*. 34(8). p. 1091–1096.

- DROPPA-ALMEIDA, D., FRANCESCHI, E. & PADILHA, F.F. (2018). Immune-informatic analysis and design of peptide vaccine from multi-epitopes against *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Bioinformatics and Biology Insights*. 12.
- DUARTE, M.C., LAGE, D.P., MARTINS, V.T., COSTA, L.E., LAGE, L.M.R., CARVALHO, A.M.R.S., LUDOLF, F., SANTOS, T.T.O., ROATT, B.M., MENEZES-SOUZA, D., FERNANDES, A.P., TAVARES, C.A.P. & COELHO, E.A.F. (2016a). A vaccine combining two *Leishmania braziliensis* proteins offers heterologous protection against *Leishmania infantum* infection. *Molecular Immunology*. 76. p. 70–79.
- FONTAINE, M.C., BAIRD, G., CONNOR, K.M., RUDGE, K., SALES, J. & DONACHIE, W. (2006). Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vaccine*. 24(33–34). p. 5986–5996.
- GASCOIGNE, E., OGDEN, N., LOVATT, F. & DAVIES, P. (2020). Update on caseous lymphadenitis in sheep. *In Practice*. 42(2). p. 105–114.
- HE, P., ZOU, Y. & HU, Z. (2015). Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 11(2). p. 477–488.
- HODGSON, A.L.M., KRYWULT, J., CORNER, L.A., ROTHEL, J.S. & RADFORD, A.J. (1992). *Rational Attenuation of Corynebacterium pseudotuberculosis: Potential Cheesy Gland Vaccine and Live Delivery Vehicle*, Available at: <https://journals.asm.org/journal/iai>.
- HOGENSECH, H., O'HAGAN, D.T. & FOX, C.B. (2018). Optimizing the utilization of aluminum adjuvants in vaccines: you might just get what you want. *npj Vaccines*. 3(1).
- LEAL, K.S., DE OLIVEIRA SILVA, M.T., DE FÁTIMA SILVA REZENDE, A., BEZERRA, F.S.B., BEGNINI, K., SEIXAS, F., COLLARES, T., DELLAGOSTIN, O., PORTELA, R.W., DE CARVALHO AZEVEDO, V.A. & BORSUK, S. (2018a). Recombinant *M. bovis* BCG expressing the PLD protein promotes survival in mice challenged with a *C. pseudotuberculosis* virulent strain. *Vaccine*. 36(25). p. 3578–3583.

- LOPES BASTOS, B. (2012). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*. 01(S4).
- MAGDY SELIM, A., ATWA, S.M., EL GEDAWY, A.A. & YOUNIS, E.E. (2022). Epidemiological, bacteriological and molecular studies on caseous lymphadenitis in sheep of Dakhlia, Egypt. *Animal Biotechnology*. 33(7). p. 1655–1660.
- MOYLE, P.M. & TOTH, I. (2013). Modern Subunit Vaccines: Development, Components, and Research Opportunities. *ChemMedChem*. 8(3). p. 360–376.
- NOZAKI, C.N., FARIA, M.A.R. & MACHADO, T.M.M. (2000). EXTIRPAÇÃO CIRÚRGICA DOS ABSCESSOS DA LINFADENITE CASEOSA EM CAPRINOS. *Arquivos do Instituto Biológico*. 67(2). p. 187–189.
- OREIBY, A.F. (2015). Diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goat. *Small Ruminant Research*. 123(1). p. 160–166.
- O'REILLY, K.M., GREEN, L.E., MALONE, F.E. & MEDLEY, G.F. (2008). Parameter estimation and simulations of a mathematical model of *Corynebacterium pseudotuberculosis* transmission in sheep. *Preventive Veterinary Medicine*. 83(3–4). p. 242–259.
- PACHECO, L.G.C., PENA, R.R., CASTRO, T.L.P., DORELLA, F.A., BAHIA, R.C., CARMINATI, R., FROTA, M.N.L., OLIVEIRA, S.C., MEYER, R., ALVES, F.S.F., MIYOSHI, A. & AZEVEDO, V. (2007). Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *Journal of Medical Microbiology*. 56(4). p. 480–486.
- PASTOR-FERNÁNDEZ, I., ARRANZ-SOLÍS, D., REGIDOR-CERRILLO, J., ÁLVAREZ-GARCÍA, G., HEMPHILL, A., GARCÍA-CULEBRAS, A., CUEVAS-MARTÍN, C. & ORTEGA-MORA, L.M. (2015). A vaccine formulation combining rhoptry proteins NcROP40 and NcROP2 improves pup survival in a pregnant mouse model of neosporosis. *Veterinary parasitology*. 207(3–4). p. 203–215. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25579396/> [Accessed April 17, 2022].
- PAVAN, M.E., ROBLES, C., CAIRÓ, F.M., MARCELLINO, R. & PETTINARI, M.J. (2012). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep by PCR-

- restriction analysis using the RNA polymerase β -subunit gene (*rpoB*). *Research in Veterinary Science*. 92(2). p. 202–206.
- PÉPIN, M., SEOW, H.F., CORNER, L., ROTHÉL, J.S., HODGSON, A. & WOOD, P.R. (1997). Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. *Veterinary research*,. 28(2). p. 149–163.
- PINHO, J.M.R., DORELLA, F.A., DA, K., COELHO, S., FONSECA, C.T., CARDOSO, F.C., MEYER, R., WAGNER, R., PORTELA, D., OLIVEIRA, S.C., MIYOSHI, A. & AZEVEDO, V. (2009). *Immunization with Recombinant Corynebacterium pseudotuberculosis Heat-Shock Protein (Hsp)-60 is Able to Induce an Immune Response in Mice, But Fails to Confer Protection Against Infection*,
- DE PINHO, R.B., DE OLIVEIRA SILVA, M.T., BEZERRA, F.S.B. & BORSUK, S. (2021). Vaccines for caseous lymphadenitis: up-to-date and forward-looking strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 105(6). p. 2287–2296.
- PORTO, L.L.D.M.A., SALUM, W.B. & ALVES, C. (2013). Caracterização da ovinocaprino cultura de corte na região do Centro Norte Baiano. *Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional*. v. 9, n. 1. p. 281–296.
- PRINCIPI, N. & ESPOSITO, S. (2018). Aluminum in vaccines: Does it create a safety problem? *Vaccine*. 36(39). p. 5825–5831.
- QIAN, F., WU, Y., MURATOVA, O., ZHOU, H., DOBRESU, G., DUGGAN, P., LYNN, L., SONG, G., ZHANG, Y., REITER, K., MACDONALD, N., NARUM, D.L., LONG, C.A., MILLER, L.H., SAUL, A. & MULLEN, G.E.D. (2007). Conjugating recombinant proteins to *Pseudomonas aeruginosa* ExoProtein A: a strategy for enhancing immunogenicity of malaria vaccine candidates. *Vaccine*. 25(20). p. 3923. Available at: [/pmc/articles/PMC1940062/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1940062/) [Accessed April 17, 2022].
- REBOUÇAS, M.F., LOUREIRO, D., BASTOS, B.L., MOURA-COSTA, L.F., HANNA, S.A., AZEVEDO, V., MEYER, R. & PORTELA, R.W. (2013). Development of an indirect ELISA to detect *Corynebacterium pseudotuberculosis* specific antibodies in sheep employing T1 strain culture supernatant as antigen. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 33(11). p. 1296–1302.

- REZENDE, A. DE F.S., BRUM, A.A., REIS, C.G., ANGELO, H.R., LEAL, K.S., SILVA, M.T. DE O., SIMIONATTO, S., AZEVEDO, V., SANTOS, A., PORTELA, R.W., DELLAGOSTIN, O. & BORSUK, S. (2016). In silico identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigenic targets and application in immunodiagnosis. *Journal of Medical Microbiology*. 65(6). p. 521–529.
- REZENDE, A. F.S., BRUM, A.A., BEZERRA, F.S.B., BRAITE, D.C., SÁ, G.L., THUROW, H.S., SEIXAS, F.K., AZEVEDO, V.A.C., PORTELA, R.W. & BORSUK, S. (2020). Assessment of the acid phosphatase CP01850 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit vaccine formulations against caseous lymphadenitis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*. 72(1). p. 199–207.
- RIBEIRO, D., ROCHA, F.D.S., LEITE, K.M.C., SOARES, S.D.C., SILVA, A., PORTELA, R.W.D., MEYER, R., MIYOSHI, A., OLIVEIRA, S.C., AZEVEDO, V. & DORELLA, F.A. (2014). An iron-acquisition-deficient mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis* efficiently protects mice against challenge. *Veterinary Research*. 45(1).
- RUIZ, H., FERRER, L.M., RAMOS, J.J., BASELGA, C., ALZUGUREN, O., TEJEDOR, M.T., DE MIGUEL, R. & LACASTA, D. (2020). The relevance of caseous lymphadenitis as a cause of culling in adult sheep. *Animals*. 10(11). p. 1–13.
- DE SÁ GUIMARÃES, A., BORGES DO CARMO, F., PAULETTI, R.B., SEYFFERT, N., RIBEIRO, D., LAGE, A.P., HEINEMANN, M.B., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V. & GUIMARÃES GOUVEIA, A.M. (2011). CASEOUS LYMPHADENITIS: EPIDEMIOLOGY, DIAGNOSIS, AND CONTROL. *REVIEW: VETERINARY MICROBIOLOGY*. 2(2). p. 33–43.
- SCHOLL, N.R., SILVA, M.T. DE O., BARBOSA, T.N., DE PINHO, R.B., ALVES, M.S.D., PORTELA, R.W., AZEVEDO, V.A. DE C. & BORSUK, S. (2023). Evaluation of the Association of Recombinant Proteins NanH and PknG from *Corynebacterium pseudotuberculosis* Using Different Adjuvants as a Recombinant Vaccine in Mice. *Vaccines*. 11(3). p. 519.
- SEYFFERT, N., GUIMARÃES, A.S., PACHECO, L.G.C., PORTELA, R.W., BASTOS, B.L., DORELLA, F.A., HEINEMANN, M.B., LAGE, A.P., GOUVEIA, A.M.G., MEYER, R., MIYOSHI, A. & AZEVEDO, V. (2010). High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium*

- pseudotuberculosis secreted proteins-based ELISA. *Research in Veterinary Science*. 88(1). p. 50–55.
- SHADNEZHAD, A., NAEGELI, A. & COLLIN, M. (2016). CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* is an endo- β -N-acetylglucosaminidase. *BMC Microbiology*. 16(1). p. 1–10.
- SILVA, J.W., DROPPA-ALMEIDA, D., BORSUK, S., AZEVEDO, V., PORTELA, R.W., MIYOSHI, A., ROCHA, F.S., DORELLA, F.A., VIVAS, W.L., PADILHA, F.F., HERNÁNDEZ-MACEDO, M.L. & LIMA-VERDE, I.B. (2014). *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40 recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis. *BMC Veterinary Research*. 10(1).
- SILVA, M.T. DE O., 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. (2018). Association of *Corynebacterium pseudotuberculosis* recombinant proteins rCP09720 or rCP01850 with rPLD as immunogens in caseous lymphadenitis immunoprophylaxis. *Vaccine*. 36(1). p. 74–83.
- SILVA, M.T. DE O., PINHO, R.B. DE, BEZERRA, F.S.B., CAMPOS, V.F., AZEVEDO, V. & BORSUK, S. (2019). Establishment of an objective endpoint in mice model for caseous lymphadenitis vaccine trials. *Veterinary Microbiology*. 230. p. 86–89.
- SILVA, M.T. DE O., PINHO, R.B. DE, FONSECA, B. DA R., BEZERRA, F.S.B., SOUSA, F.S.S., SEIXAS, F.K., COLLARES, T., NASCIMENTO, R.J.M., PORTELA, R.W., AZEVEDO, V.A.C. & BORSUK, S. (2020). NanH and PknG putative virulence factors as a recombinant subunit immunogen against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *Vaccine*. 38(51). p. 8099–8106.
- SILVA, W.M., DORELLA, F.A., SOARES, S.C., SOUZA, G.H.M.F., CASTRO, T.L.P., SEYFFERT, N., FIGUEIREDO, H., MIYOSHI, A., LE LOIR, Y., SILVA, A. & AZEVEDO, V. (2017). A shift in the virulence potential of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis after passage in a murine host demonstrated through comparative proteomics. *BMC Microbiology*. 17(1).
- SOTO, A., ZAPARDIEL, J. & SORIANO, F. (1994). Evaluation of API Coryne system for identifying coryneform bacteria. *Journal of Clinical Pathology*. 47(8). p. 756–759.

- SOUCEK, A.J., MICHALEC, CESTM.R. & SOUCKOVA, A. (1971). IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A NEW ENZYME OF THE GROUP 'PHOSPHOLIPASE D' ISOLATED FROM CORYNEBACTERIUM OVIS. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA - Enzimology*. 227(1). p. 116–128.
- SOUZA, S.O. DE, LEMOS, L.A. DE, TEREZINHA, A., WOUTERS, B., WOUTERS, F., BOABAID, F.M., CASAGRANDE, R.A., TERUMI, T., WATANABE, N., GUERRA, P. & DRIEMEIER, D. (2012). Linfadenite caseosa como causa de paralisia de membros pélvicos em ovinos no Estado do Rio Grande do Sul Caseous Lymphadenitis as a Cause of Hind Limb Paralysis in Sheep in Rio Grande do Sul State. . 40(4). p. 1085. Available at: www.ufrgs.br/actavet.
- THAIS DE OLIVEIRA SILVA, M., BARROS DE PINHO, R., DA ROCHA FONSECA, B., SILVESTRE BRILHANTE BEZERRA, F., SEVERO SABEDRA SOUSA, F., KOMMLING SEIXAS, F., COLLARES, T., JOSÉ MEYER NASCIMENTO, R., WAGNER PORTELA, R., ARISTON CARVALHO AZEVEDO, V. & BORSUK, S. (2020). NanH and PknG putative virulence factors as a recombinant subunit immunogen against Corynebacterium pseudotuberculosis infection in mice. *Vaccine*. 38(51). p. 8099–8106.
- VARELA-CASTRO, L., LARA-VERGARA, J., ORTEGA, N., SALINAS, J., COLOM-CADENA, A., LAVÍN, S., TIZZANI, P., VELARDE, R., SERRANO, E. & MENTABERRE, G. (2017). Endemic caseous lymphadenitis in a wild Caprinae population. *The Veterinary record*. 180(16). p. 405. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28275091/> [Accessed April 17, 2022].
- WALKER, J., JACKSON, H.J., EGGLETON, D.G., MEEUSEN, E.N.T., WILSON, M.J. & BRANDON, M.R. (1994). *Identification of a Novel Antigen from Corynebacterium pseudotuberculosis That Protects Sheep against Caseous Lymphadenitis*, Available at: <https://journals.asm.org/journal/iai>.
- WILLIAMSON, L.H. (2001). Caseous lymphadenitis in small ruminants. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. 17(2).
- WILSON, M.J., BRANDON, M.R. & WALKER, J. (1995). *Molecular and Biochemical Characterization of a Protective 40-Kilodalton Antigen from Corynebacterium pseudotuberculosis*, Available at: <https://journals.asm.org/journal/iai>.

WINDSOR, P.A. (2011). Control of Caseous Lymphadenitis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. 27(1). p. 193–202.

8 ANEXOS

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

PARECER Nº
PROCESSO Nº

18/2019/CEEA/REITORIA
23110.012522/2019-21

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação de formulações vacinais contendo antígenos recombinantes purificados e não purificados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* contra linfadenite caseosa**”, processo nº 23110.012231/2019-32, sob a responsabilidade de Sibeles Borsuk que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilos Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 16/04/2019.

Finalidade

(X) Pesquisa

() Ensino

Vigência da autorização

01/05/2019 a 01/05/2023

Espécie/linhagem/raça

Mus musculus/Balb/c

Nº de animais

300

Idade

6 – 8 semanas

Sexo

Fêmeas

Origem

Biotério Central/UFPeI

Ccódigo para cadastro nº CEEA 12231-2019

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix*Presidente da CEEA*

Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX, Médico Veterinário**, em 18/04/2019, às 13:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0511493** e o código CRC **7E303A36**.

Referência: Processo nº 23110.012522/2019-21

SEI nº 0511493



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

DESPACHO

Processo nº 23110.012522/2019-21

Interessado: SIBELE BORSUK

Encaminhado a correção do número de cadastro do processo: **12522-2019**



Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX, Médico Veterinário**, em 18/04/2019, às 14:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0511502** e o código CRC **2DAC56CF**.