

VACINA BCG SUPEREXPRESSANDO Ag85B DEMONSTRA INDUÇÃO DE PROTEÇÃO CONTRA TUBERCULOSE BOVINA

CAROLINE RIZZI¹; MARÍA VERÓNICA BIANCO²; FEDERICO C. BLANCO²; ANGEL CATALDI²; FABIANA BIGI²; ODIR A. DELLAGOSTIN¹

¹Laboratório de Vacinologia. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Universidade Federal de Pelotas, Brasil. ²Instituto de Biotecnología, CICVyA-INTA, Argentina.
e-mail: ccrizzi@yahoo.com.br; odirad@terra.com.br

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) bovina é uma zoonose causada por *Mycobacterium bovis* e representa um grave problema econômico e de saúde pública na América Latina. A vacinação dos bovinos pode ser uma alternativa barata para o controle da infecção, que nestes países se apresenta endêmica. Embora diversos estudos demonstrem que a proteção induzida nestes animais pela administração do bacilo Calmette-Guérin (BCG), vacina amplamente utilizada contra TB em humanos, é incompleta, esta cepa atenuada ainda pode ser empregada como um sistema para apresentação de antígenos heterólogos (WATERS et al., 2012).

O antígeno 85B (Ag85B) é uma proteína imunodominante de *M. bovis* e demonstra capacidade de induzir resposta imune protetora contra a TB bovina em modelos animais (HORWITZ et al., 2006). A fim de melhorar a eficácia da vacina BCG, nós expressamos o Ag85B em um sistema de expressão desenvolvido em nosso laboratório, que emprega um mutante de BCG Pasteur auxotrófico para leucina (BCG Pasteur $\Delta leuD$) e um vetor (pUP410) que complementa esta mutação (BORSUK et al., 2007).

A eficácia de candidatos a vacinas contra TB é atualmente determinada através de ensaio de desafio em modelo animal, seguido de autópsia, a procura de lesões (granulomas) em pulmões e linfonodos. Posteriormente, os granulomas são submetidos à análise histopatológica. Vacinas bem sucedidas geram respostas que determinam ausência de lesão ou lesões de gravidade reduzida em relação ao grupo controle (WATERS et al., 2012). Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da vacina recombinante previamente construída através de desafio em bovinos contra *M. bovis*, seguido de análises patológicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A vacina recombinante BCG *leuD*/85B foi construída conforme descrito por RIZZI et al. (2011). Para o ensaio de desafio, três grupos de cinco/seis terneiros da raça holandesa (quatro meses de idade) foram inoculados por via subcutânea com 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC) de BCG Pasteur (grupo A), BCG *leuD*/85B (grupo B) ou solução salina tamponada (PBS- grupo C). Oito semanas após a vacinação, os animais foram infectados por via intratraqueal com 10^6 UFC de *M. bovis*, conforme descrito por MEIKLE et al. (2011).

Dezesseis semanas após a infecção, os terneiros foram eutanaziados e os pulmões, linfonodos da cabeça e dos pulmões foram analisados em busca de lesões granulomatosas. As lesões macroscópicas foram discriminadas conforme WEDLOCK et al. (2008). Os tecidos que apresentaram lesões foram fixados em 10% de formol e processados para exame histológico. As lesões microscópicas

foram classificadas conforme WANGOO et al. (2005) e posteriormente cada amostra foi categorizada conforme o número e severidade dos granulomas. Diferenças nos escores patológicos foram analisadas utilizando-se o teste não paramétrico Mann-Whitney.

Todas as experimentações animais foram realizadas no interior de instalações de biossegurança do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA), Hurlingham, Argentina, sob a aprovação do comitê de ética local (CICUAE), número 18/2011.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Embora todos os grupos de animais apresentassem lesões tuberculosas nos pulmões, o número de lesões variou entre os grupos (Figura 1). Enquanto os animais dos grupos controles (A e B) apresentaram lesões múltiplas e caseosas, apenas um animal do grupo vacinado com BCG *leuD/85B* apresentou uma única lesão pulmonar.

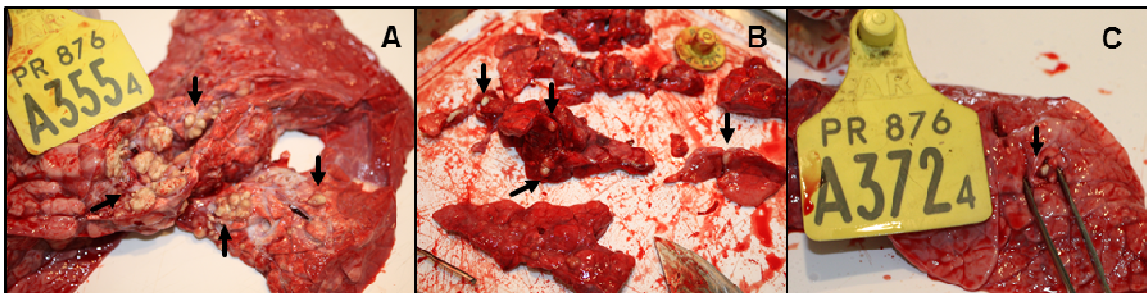


Figura 1. Morfologia das lesões tuberculosas pulmonares presentes nos animais não vacinados (A), vacinados com BCG Pasteur (B) e com BCG $\Delta leuD/85B$ (C).

O escore descrito por WEDLOCK et al. (2008) é uma classificação quantitativa da severidade da TB bovina, considerando o número e o tamanho das lesões macroscópicas presentes em pulmões e linfonodos. Este escore permite avaliar a eficácia da vacina candidata em relação aos animais controle. O escore médio de lesões pulmonares e das lesões patológicas totais (pulmões e linfonodos) dos grupos vacinados com as cepas de BCG foi estatisticamente menor do que o grupo vacinado com PBS (Figura 2).

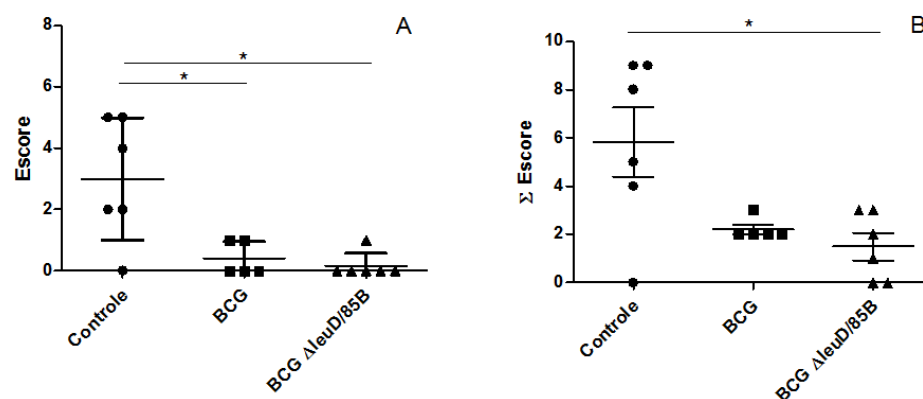


Figura 2. Eficácia protetora medida pela patologia macroscópica, conforme escore de Wedlock. (A), escore médio da patologia dos pulmões; (B), escore médio da patologia de todas as lesões (pulmões e linfonodos). $P < 0,05$.

Por outro lado, os grupos vacinados com BCG Pasteur e BCG $\Delta leuD/85B$ apresentaram número reduzido de lesões nos linfonodos comparados aos animais vacinados com PBS, mas não apresentaram diferenças estatísticas (dados não apresentados).

WANGOO et al. (2005) classificam os granulomas em diferentes estágios histopatológicos (I a IV), que ajudam a diferenciar a doença ativa de doença contida ou inativa. As lesões nos estágios III e IV, caracterizadas por grandes regiões de necrose caseosa e presença de micobactérias extracelulares, são determinantes na disseminação da doença no organismo e transmissão da patologia. Enquanto os animais vacinados com BCG apresentaram granulomas tipo III e IV, a maioria dos bovinos vacinados com BCG $\Delta leuD/85B$ exibiram apenas áreas pneumônicas e infiltração peribronquial, estágios anteriores à categoria I (Figura 3).

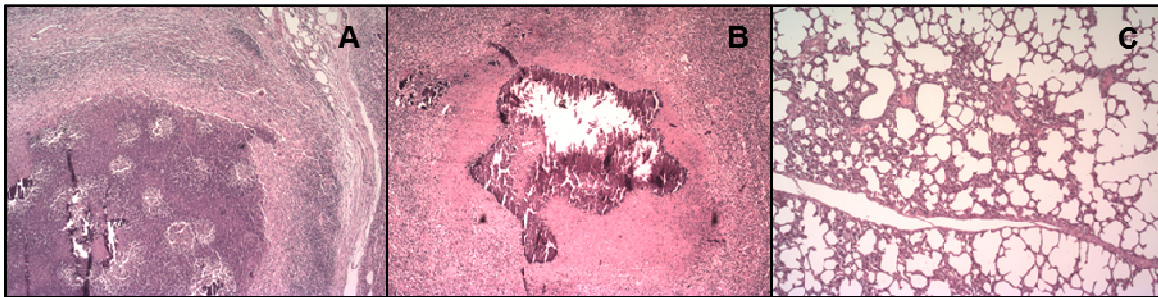


Figura 3. Histopatologia das lesões tuberculosas pulmonares presentes nos animais vacinados com BCG Pasteur (A e B) e com BCG $\Delta leuD/85B$ (C). Lesões maduras, estadiadas como IV (A) e III (B) predominavam nos animais do grupo BCG; já no grupo BCG $\Delta leuD/85B$ não houve o desenvolvimento de lesões, apenas pneumonia e infiltração de células mononucleares.

Posteriormente, a histopatologia de cada animal foi classificada num escore de 0 a 9 conforme o número e o estágio de Wangoo que os granulomas microscópicos se apresentaram. Neste escore, os animais vacinados com BCG $\Delta leuD/85B$ demonstraram patologia microscópica significativamente menor que os grupos vacinados com BCG Pasteur e PBS (Figura 4).

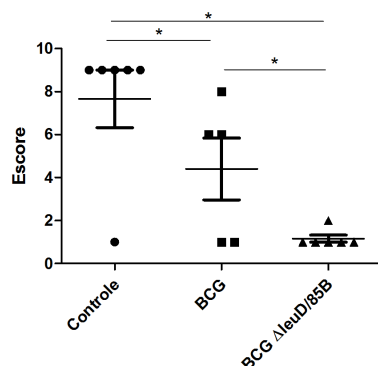


Figura 4. Eficácia protetora avaliada por histopatologia dos pulmões em animais individuais. Os valores do escore histopatológico são mais altos conforme o aumento do número e da severidade das lesões. $P < 0,05$.

4. CONCLUSÕES

Estes resultados indicam que a vacina BCG $\Delta leuD/85B$ protege bovinos melhor que a BCG, demonstrado através da severidade das lesões nos pulmões

e linfonodos. Para completar este estudo, parâmetros imunológicos como ativação de células T e níveis de citocinas e sua correlação com a gravidade das lesões serão avaliados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORSUK, S.; MENDUM, T.; FAGUNDES, M.Q.; MICHELON, M.; CUNHA, C.W.; MCFADDEN, J.; DELLAGOSTIN, O.A. Auxotrophic complementation as a selectable marker for stable expression of foreign antigens in *Mycobacterium bovis* BCG. **Tuberculosis**, v. 87, p. 474-480, 2007.

HORWITZ, M.A.; HARTH, G.; DILLON, B.J.; MASLESA-GALIC S. A novel recombinant mycobacterial vaccine against bovine tuberculosis more potent than BCG. **Vaccine**, v. 24, p. 1593-1600, 2006.

MEIKLE, V.; BIANCO, M.V.; BLANCO, F.C; GIOFFRE, A.; GARBACCIO,S.; VAGNONI, L.; DI, R.J; CANAL, A.; BIGI, F.; CATALDI, A. Evaluation of pathogenesis caused in cattle and guinea pig by a *Mycobacterium bovis* strain isolated from wild boar. **BMC Veterinary Research**, v. 7, p. 37-42, 2011.

RIZZI, C.; LEAL, K.S.; STURBELLE, R.; SA, G.L.; LEAL, F.; DELLAGOSTIN, O.A. Superexpressão do antígeno 85B de *Mycobacterium bovis* em BCG Pasteur $\Delta leuD$ e avaliação da resposta humoral em camundongos. In: **XIII ENPOS**, Pelotas, 2011. Anais... Pelotas: Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 2011. v.1.

WANGOO, A.; JOHNSON, L.; GOUGH, J., ACKBAR, R.; INGLUT, S.; HICKS, D.; SPENCER, Y.; HEWINSON, G., VONDERMEIER, M. Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, gammadelta (WC1+) T cells and CD 68+ cells. **Journal of Comparative Pathology**, v.133, p. 223-234, 2005.

WATERS, W.R.; PALMER, M.V; BUDDLE, B.M.; VORDERMEIER, H.M. Bovine tuberculosis vaccine research: historical perspectives and recent advances. **Vaccine**, v. 30, p. 2611-2622, 2012.

WEDLOCK, D.N.; DENIS, M.; PAINTER, G.F.; AINGE, G.D.; VORDERMEIER, H.M.; HEWINSON, R.G.; BUDDLE, B.M. Enhanced protection against bovine tuberculosis after coadministration of *Mycobacterium bovis* BCG with a mycobacterial protein vaccine-adjuvant combination but not after coadministration of adjuvant alone. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, p. 765-772, 2008.