

## CONSTRUÇÃO DE VACINAS DE DNA PARA O CONTROLE DA LINFADENITE CASEOSA

**BRUM, ALEXANDRE<sup>1\*</sup>; GILL, PABLO<sup>1</sup>; AZEVEDO, VASCO<sup>2</sup>; BORSUK, SIBELE<sup>1\*\*</sup>**

<sup>1</sup> Laboratório de Pesquisa em Doença Infecciosas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico - Biotecnologia – UFPel; <sup>2</sup> Departamento de Biologia Geral, UFMG; (alex.brum@bol.com.br\* - sibeleborsuk@gmail.com\*\*)

### 1. INTRODUÇÃO

A Linfadenite Caseosa (LC) causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, é uma doença infectocontagiosa que acomete ruminantes, entre eles caprinos e ovinos, de importância para o sul do Brasil. Essa bactéria, gram positiva não esporulada, pode permanecer viável por um longo período em carne congelada, fezes, pele, solo, intestino e também em vísceras contaminadas (ANDERSON, 2005), causando a condenação da carcaça dos animais, a perda da pele ocasionada pelos inúmeros abscessos podendo levar à morte (DORELLA, MEYER et al., 2002). Sua incidência ocasiona grandes perdas econômicas especialmente em regiões tropicais e subtropicais (SOBRINHO et al., 2001). É endêmica no Brasil com prevalência em torno de 30% (VESCHI, 2005). Trata-se de uma doença de fácil contágio, bastando apenas a presença de animais infectados em um rebanho sadio, para que aja a contaminação por spray ou contato direto (SOBRINHO, 2001). Adicionalmente, o tratamento com antibióticos pode não ser viável devido ao alto custo, além de que podem não atravessar a capsula dos abscessos, tornando-se praticamente impossível erradicar a doença (ALVES, 1997).

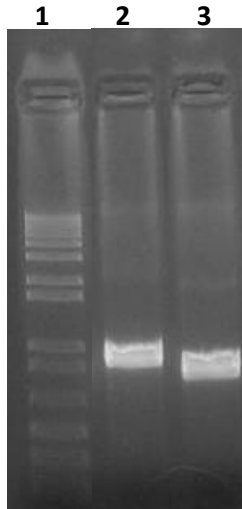
Vacina de DNA contra LC já foi testada, porém com resultado pouco satisfatório, induzindo resposta imune, mas sem conferir proteção efetiva contra infecção por *C. pseudotuberculosis* (COSTA et al., 2011). Com o sequenciamento do genoma de *C. pseudotuberculosis*, possibilitou a identificação de novos alvos para uso em vacinas recombinantes e de DNA (SILVA, et al., 2011). Assim, o objetivo deste trabalho foi a construção de vacinas de DNA para o controle da LC utilizando os genes Cp1002\_1802 e Cp1002\_1957 de *C. pseudotuberculosis*.

### 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a construção do vetor de expressão em células eucarióticas, os genes Cp1002\_1802 e Cp1002\_1957 de *C. pseudotuberculosis* foram amplificados por PCR utilizando os primers F5' ACCATGGAAATTCCTATACCGACCC e R5' GGC GAATTCTCACGTGACGTCCGCGe F5': ACCATGGGGCCTCGCGACTGGCTGCGC 3' R5' CCG GAA TTC TTA CCA GGC GTT CAT AAC GT 3' respectivamente. Os genes foram ligados ao vetor pTARGET (Promega). O produto da ligação foi transformado em células de *E. coli* Top10 por eletroporação. Após período de recuperação das células em shaker a 37°C – 2h fez-se a semeadura em superfície por espalhamento em meio sólido LB/ampicilina/IPTG/X-Gal. Em função da presença do gene *lacIqZΔM15* no vetor pTARGET, foram selecionadas as colônias que apresentavam-se com aspecto esbranquiçado. Após foram cultivadas em meio líquido LB/ampicilina para extração do vetor com kit promega Pure yield Plasmid Miniprep Sistem para posterior transfecção para células VERO.

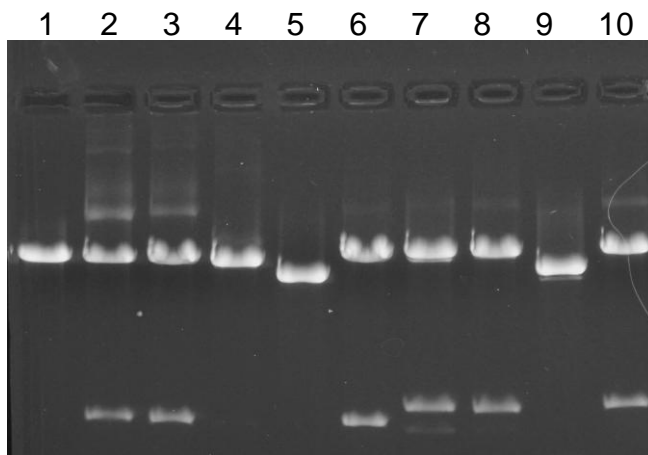
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Um fragmento de 1038pb e 933pb correspondentes aos genes Cp1002\_1802 e Cp1002\_1957 foram amplificados por PCR (Fig. 01) e ligados ao vetor de expressão pTARGET.



**Figura 1:** Eletroforese em gel de agarose 1%. (1) Marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). (2) gene Cp1002\_1802 (3) gene Cp1002\_1957.

Após a extração do plasmídio multiplicado em *E.coli* Top 10 foi feita a digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* para confirmação dos clones recombinantes, devendo haver liberação dos genes conforme mostrado na figura 2.



**Figura 2:** Gel de agarose 1% dos clones selecionados mostrando a liberação dos insertos 1957 (2 ao 6) e 1802 (7 ao 10). O número 1 refere-se ao controle negativo.

Os plasmídeos recombinantes foram o pTARGET/1957 clones 2 e 3 e pTARGET/1802 clones 6, 7, 8 e 10. Sendo assim, o material obtido está pronto para transfecção em células VERO.

Diferentes formulações vacinais vêm sendo testadas, como o uso de bactérias atenuadas ou inativadas, frações contendo antígenos da parede bacteriana ou do sobrenadante de cultura e ainda uma mistura de componentes celulares e sobrenadante (DORELLA et al., 2009) sem apresentarem estimulação celular mensurável, entre outros fatores que demonstram a necessidade de novos estudos na busca de se produzir vacinas mais eficientes (HODGSON et al., 1999). Vacinas DNA já foram utilizadas em cobaias com resultados pouco satisfatórios (COSTA et al. 2011), entretanto, a rota de imunização destes vetores tem influencia

relevante na eficiência das vacinas de DNA para o controle de LC (DE ROSE, et al.2002).

As proteínas CP1002\_1802 e CP1002-1957 são proteínas de secretoma de *C. pseudotuberculosis*, portanto, com potencial antigênico acredita-se que são bons alvos para o desenvolvimento de uma vacina para o controle da LC.

#### 4. CONCLUSÃO

As vacinas de DNA (pTARGET/1802 e pTARGET/1957) foram construídas com êxito. Posteriormente será feita a transfecção em células VERO para avaliar a expressão destas proteínas em células eucarióticas para em seguida imunizar camundongos, com a finalidade de avaliar o potencial imunogênico destas vacinas para o controle da linfadenite caseosa.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. Linfadenite caseosa – Recomendações e medidas profiláticas. **Embrapa** – Comunicado Técnico, n. 33, p. 1-4, 1997.
- ANDERSON, D. E.; RINGS, D. M.; PUGH, D. G. Enfermidades do Sistema tegumentar. In: PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, p. 232-233. 2005.
- DE ROSE, R.; ENNENT, J.; MCWATERS, P.; CHAPLIN, P.J.; Efficacy of DNA vaccination by different routes of immunisation in sheep. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 90, 55-63. 2002.
- DORELLA, F.A.; PACHECO, L.G.C.; SEYFFERT, N.; PORTELA, R.W.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. **Expert Review of Vaccines.** 8, 205-213. 2009.
- HODGSON, A.L.; BIRD, P.; NISBET, I.T. Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **J. Bacteriol.** 172, 1256-1261. 1990.
- MEYER, R.; CARMINATI, R.; CERQUEIRA, R. B.; VALE, V.; VIEGAS, S.; MARTINEZ, T.; NASCIMENTO, I.; SCAER, R.; SILVA, J. A. H.; RIBEIRO, M.; RÉGIS, M.; PAULE, B.; FREIRE, S. M. Avaliação da resposta imune humoral em caprinos inoculados com uma vacina viva atenuada liofilizada contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*, **R. Ci. Méd. Biol.**, v. 1, n. 1, p. 42-48, 2002.
- SOBRINHO, A. G. S. Principais Enfermidades dos Ovinos. In: Criação de ovinos. 2.ed. Jaboticabal: **Funep**, p.220-221. 2001.
- VESCHI, J. L. Linfadenite caseosa. In: **VII ENCONTRO DE CAPRINOCULTORES DO SUL DE MINAS E MÉDIA MOGIANA**, Espírito Santo do Pinhal. Anais. 2005.

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.; Molecular characterization of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* hsp60-hsp10 operon, and evaluation of the immune response and protective efficacy induced by hsp60 DNA vaccination in mice. **BMC Res Notes**. V.20; n<sup>o</sup>4, p.243, 2011.

SILVA A, SCHNEIDER MP, CERDEIRA L, BARBOSA MS, RAMOS RT, CARNEIRO AR, SANTOS R, LIMA M, D'AFONSECA V, ALMEIDA SS, SANTOS AR, SOARES SC, PINTO AC, ALI A, DORELLA FA, ROCHA F, DE ABREU VA, TROST E, TAUCH A, SHPIGEL N, MIYOSHI A, AZEVEDO V. Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* I19, a strain isolated from a cow in Israel with bovine mastitis. **J Bacteriol**. n<sup>o</sup>193(1), p.323-4, 2011.