

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS IMUNÓGENOS DE
Corynebacterium pseudotuberculosis E AVALIAÇÃO DE VACINAS
DE DNA E DE SUBUNIDADE CONTRA LINFADENITE CASEOSA**

Cleber Eduardo Galvão Carvalho

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
DEZEMBRO DE 2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS IMUNÓGENOS DE
Corynebacterium pseudotuberculosis E AVALIAÇÃO DE VACINAS
DE DNA E DE SUBUNIDADE CONTRA LINFADENITE CASEOSA**

**IDENTIFICATION OF POTENTIAL *Corynebacterium pseudotuberculosis*
IMMUNOGENS AND EVALUATION OF DNA AND SUBUNIT VACCINES AGAINST
CASEOUS LYMPHADENITIS**

Cleber Eduardo Galvão Carvalho

Orientadora: Grácia Maria Soares Rosinha

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciência Animal. Área de concentração: Saúde Animal.

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
DEZEMBRO DE 2015**

Certificado de Aprovação

Cleber Eduardo Galvão Carvalho

**IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS IMUNÓGENOS DE
Corynebacterium pseudotuberculosis E AVALIAÇÃO DE VACINAS
DE DNA E DE SUBUNIDADE CONTRA LINFADENITE CASEOSA**

**IDENTIFICATION OF POTENTIAL *Corynebacterium pseudotuberculosis* IMMUNOGENS
AND EVALUATION OF DNA AND SUBUNIT VACCINES AGAINST CASEOUS
LYMPHADENITIS**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, como
requisito à obtenção do título de
doutor em Ciência Animal.

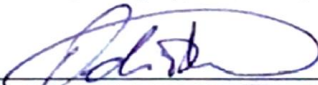
Área de concentração: Saúde Animal.

Aprovado(a) em: 03/12/2015

BANCA EXAMINADORA:



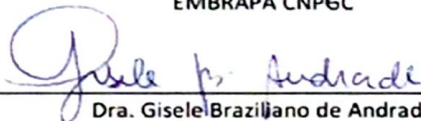
Dra. Grácia Maria Soares Rosinha
(EMBRAPA CNPGC) – (Orientadora)



Dr. Osir Antônio Dellagostin
UFPEL



Dr. Cleber Oliveira Soares
EMBRAPA CNPGC



Dra. Gisele Braziliiano de Andrade
UCDB



Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos
UFMS

Dedico este trabalho à minha mãe, Maria Elena Silva Galvão, pela sua extrema importância em minha vida. Cheguei até aqui por causa de sua dedicação para com a minha vida. Dedico este trabalho ao meu tio Paulo Galvão, pelo exemplo de pai e exemplo de profissionalismo dedicado à minha formação. Dedico também aos meus avós Vanda e Irineu, por toda dedicação e pelas boas influências em minha educação. E dedico a todos familiares e amigos que de alguma forma ou de outra contribuíram e me acompanharam nesta trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Dra. Grácia Rosinha, pela paciência, pelo ensino e pela oportunidade de realização deste estudo. À Embrapa Gado de Corte pela disposição dos laboratórios. À FUNDECT e CAPES pela bolsa de estudo e financiamento do projeto. À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pelo programa de doutorado em Ciência Animal. À Dr^a Lenita Ramires pelas discussões sobre as técnicas deste estudo. À técnica Maria Goretti pelo apoio dado em várias fases do projeto. À todos os alunos de iniciação científica, mestrado, doutorado e pós-doutorado, a todos os pesquisadores que contribuíram, e continuam contribuindo, com este estudo para o desenvolvimento de vacinas contra a linfadenite caseosa. À todos os colegas e amigos de longas datas, e o atuais, do Laboratório de Engenharia Genética Animal (LEGA) da Embrapa Gado de Corte.

“É somente através da ajuda mútua e das concessões recíprocas que um organismo agrupando indivíduos em número grande ou pequeno pode encontrar sua harmonia plena e realizar verdadeiros progressos.”

Jigoro Kano

RESUMO

CARVALHO, C.E.G. Identificação de potenciais imunógenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e avaliação de vacinas de DNA e de subunidade contra linfadenite caseosa. 2015. 116f. Tese - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2015.

A linfadenite caseosa (LC) é uma enfermidade que afeta ovinos e caprinos e ocasionalmente o homem, causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*. A LC é uma das doenças de grande importância econômica na ovinocultura e caprinocultura. Vacinas comerciais disponíveis não oferecem proteção adequada aos animais. Portanto, o desenvolvimento de vacinas mais eficientes contra LC é necessário. Desta forma, objetivou-se com este estudo construir uma biblioteca de expressão gênica de *C. pseudotuberculosis* e identificar, por imunovarredura, genes que codificam possíveis proteínas antigênicas para o desenvolvimento e avaliação de vacinas de DNA e subunidade contra LC. Uma cepa selvagem de *C. pseudotuberculosis* foi utilizada para a extração e digestão parcial do DNA genômico. Sequências entre 1.000 e 5.000 pares de bases foram cortadas do gel, purificadas e os fragmentos obtidos do DNA digerido foram ligados no vetor bacteriófago ZAP Express, empacotados em fagos e transfectados em *Escherichia coli*. Para a imunovarredura utilizou-se um pool de soros de ovinos positivos e um pool de soros negativos para LC. Na imunovarredura foram identificados quatro clones que reagiram fortemente aos soros. Os clones foram confirmados, após a realização da PCR e sequenciamento para comparação genômica de *C. pseudotuberculosis* no GenBank. Esses genes foram identificados, com identidade entre 99% e 100% e *E-value* de 0.0, como codificadores de proteínas de membrana. Proteínas desse tipo podem ser antigênicas, podendo favorecer o desenvolvimento de vacinas de subunidades ou de DNA contra LC, bem como o desenvolvimento de testes sorológicos para diagnóstico. O uso de imunovarredura de biblioteca de expressão gênica apresentou-se como uma técnica sensível e eficiente na identificação de prováveis genes imunodominantes. Um desses genes foi o Xa1 e por isso ele foi avaliado como imunógeno na forma de vacina de DNA, bem como na forma de subunidade recombinante. Camundongos foram imunizados com pcDNAXa1, pcDNAXa1+XA1r-Montanide e XA1r-Montanide e desafiados com uma cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*. O estado clínico e as alterações anatomopatológicas foram avaliadas após o desafio. A detecção de IgG específico no soro dos camundongos imunizados, bem como seus isotipos IgG1 e IgG2a, foram avaliadas por ELISA indireto. Os níveis de IFN- γ e IL-10 foram determinados por ELISA de captura a partir dos sobrenadantes de culturas de esplenócitos, estimulados com XA1r. As respostas imunes celular e humoral induzidas pelas formulações vacinais pcDNAXa1, pcDNAXa1+XA1r-Montanide e XA1r-Montanide, foram capazes de proteger camundongos após o desafio com *C. pseudotuberculosis* virulenta, resultando na sobrevivência de camundongos sem alterações clínicas e anatomopatológicas características de LC. Essas formulações podem ser promissoras contra a LC em ovinos e caprinos.

Palavras-chave: Linfadenite caseosa, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, ovinos, caprinos, vacina de DNA, vacina de subunidade.

ABSTRACT

CARVALHO, C.E.G. Identification of potential *Corynebacterium pseudotuberculosis* immunogens and evaluation of DNA and subunit vaccines against caseous lymphadenitis. 2015. 116f. Thesis - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2015.

The caseous lymphadenitis (CLA) is a disease that affects sheep and goats and occasionally humans, caused by the bacterium *Corynebacterium pseudotuberculosis*. CLA is a disease of economic importance in the sheep and goat industry. Commercial vaccines available do not provide adequate protection for animals. Therefore, the development of more efficient vaccines is required. Thus, the aim of this study was to construct a gene expression library of *C. pseudotuberculosis* and identify, for immunoscreening, genes encoding potential antigenic proteins for the development and evaluation of DNA and subunit vaccines against CLA. A wild strain of *C. pseudotuberculosis* was used for the extraction and partial digestion of genomic DNA. Sequences between 1,000 and 5,000 base pairs were excised from the gel, purified and the digested DNA fragments obtained were ligated into the phage vector ZAP Express, packaged into phage and transfected into *Escherichia coli*. For immunoscreening, we used a pool of positive sheep sera and a pool of negative sheep sera for CLA. In immunoscreening four clones were identified which reacted strongly to the sera. Clones were confirmed after the completion of PCR and sequencing for genomic comparison of *C. pseudotuberculosis* in GenBank. These genes were identified with identity between 99% and 100% and E-value of 0.0, and encoding membrane proteins. Proteins of this type may be antigenic and may promote the development of subunit vaccines or DNA from CLA, as well as the development of serological tests for diagnosis. The use of immunoscreening of gene expression library was presented as a sensitive and efficient technique to identify genes likely immunodominant. One of these genes was *Xa1* and therefore it has been reported as an immunogen in the form of DNA vaccines, as well as recombinant subunit. Mice were immunized with pcDNA*Xa1*, pcDNA*Xa1*+XA1r-Montanide and XA1r-Montanide and challenged with a virulent strain of *C. pseudotuberculosis*. The clinical status and pathological changes were evaluated after the challenge. The detection of specific IgG in the serum of immunized mice, as well as their isotypes IgG1 and IgG2a, were measured by ELISA. IFN- γ and IL-10 were determined by capture ELISA from the supernatants of splenocyte cultures stimulated with XA1r. The humoral and cellular immune responses induced by the vaccine formulations pcDNA*Xa1*, pcDNA*Xa1*+XA1r-Montanide and XA1r-Montanide, were able to protect mice after challenge with virulent *C. pseudotuberculosis*, resulting in survival of mice without clinical and pathological features CLA. These formulations may be promising against CLA in sheep and goats.

Keywords: Caseous lymphadenitis, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, sheep, goats, DNA vaccine, subunit vaccine

Sumário

INTRODUÇÃO	1
1. Estudos em vacinas contra LC	4
2. Imunidade contra <i>C. pseudotuberculosis</i>	7
2.1. Resposta Imune Inata	7
2.2. Resposta Imune Adaptativa	9
REFERÊNCIAS.....	12
ARTIGO 1.....	20
Identificação de novos antígenos de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> por imunovarredura de uma biblioteca de expressão gênica	20
RESUMO.....	20
Introdução	22
Materiais e Métodos	25
Amostras bacterianas	25
Extração do DNA genômico de <i>C. pseudotuberculosis</i>	26
Digestão enzimática parcial do DNA genômico de <i>C. pseudotuberculosis</i>	27
Ligação dos insertos ao vetor λ ZAP Express e empacotamento da reação	27
Cultivo de <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF' para transfecção	28
Amplificação da biblioteca.....	28
PCR da biblioteca	29
Amostras de soros de animais positivos para LC	30
Obtenção de soros livres de contaminantes de antígenos de <i>E. coli</i> e antígenos do fago	31
Análise dos soros limpos	32
Imunovarredura da biblioteca de expressão	33
Seleção de clones positivos	35
Amplificação por PCR dos insertos clonados no vetor λ Zap Express	35

Resultados	36
Digestão parcial do DNA genômico de <i>C. pseudotuberculosis</i> e ligação dos insertos ao vetor λ ZAP Express	36
Transfecção e titulação da reação de empacotamento do fago (UFC/mL)	36
PCR para certificação da biblioteca	37
Análise dos soros	38
Imunovarredura da biblioteca genômica de <i>C. pseudotuberculosis</i>	39
Amplificação dos insertos clonados no vetor λ Zap Express	39
Obtenção da sequência dos genes codificadores das proteínas antigênicas para <i>C. pseudotuberculosis</i>	40
DISCUSSÃO	42
Referências	48
ANEXO 1. Tabelas	53
ARTIGO 2.....	55
Imunoproteção gerada por vacinas de DNA e subunidade a partir do gene <i>Xa1</i> de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> contra linfadenite caseosa em camundongos	55
RESUMO.....	55
1. Introdução.....	56
2. Materiais e métodos.....	58
2.1. Cepas bacterianas, procedimentos de estocagem e cultura.....	58
2.2. Camundongos e ética na experimentação animal	59
2.3. Produção da vacina de DNA	59
2.4. Avaliação da expressão gênica do plasmídeo pCDNAXa1 em células eucarióticas <i>in vivo</i>	61
2.5. Produção da proteína XA1r	62
2.6. Determinação da dose de desafio	63
2.7. Imunização e desafio	64
2.8. Análise da resposta imune humoral	65

2.9. Avaliação da resposta imune celular.....	67
2.10. Análise Estatística.....	68
2.11. Avaliações das alterações clínicas e anatomopatológicas dos camundongos imunizados e desafiados	69
3. Resultados.....	70
3.1. Produção do plasmídeo vacinal pcDNAXa1 e da proteína XA1r.....	70
3.2. Resposta imune humoral	72
3.3. Resposta imune celular	75
3.4. Avaliação das alterações clínicas e anatomopatológicas na determinação da dose desafio.....	77
3.5. Estado clínico, contagem de óbitos, de sobreviventes e alterações anatomopatológicas no pós desafio dos camundongos imunizados	78
4. Discussão	85
Agradecimentos	92
Referências	93

INTRODUÇÃO

A demanda por produtos oriundos da ovinocultura e caprinocultura tais como carne, leite e pele, vem aumentando a cada ano por causa da procura pelo mercado interno e externo. Para os produtores, isso representa uma boa alternativa de trabalho e renda (COSTA et al., 2008). No ano de 2014 o rebanho de ovinos no Brasil era de 17.614.454 cabeças e o de caprinos 8.851.879, já no Estado de Mato Grosso do Sul o rebanho de ovinos era de 502.678 cabeças e o de caprinos era de 36.099 cabeças (IBGE, 2014). A produção de ovinos e caprinos no Brasil é realizada em mais de um milhão de propriedades rurais, o que gera por volta de 500 mil empregos diretos e o triplo em empregos indiretos. A maior parte dos produtores são de pequenos e médios porte, que se empenham para produzir e manter esse setor do agronegócio que é de grande importância para a pecuária do país (SCHWAB, 2011).

Se o interesse pela carne ovina e caprina aumentar, por parte do consumidor, a produção desses animais pode tomar um impulso ainda maior. O brasileiro come em média, 700 gramas de carne ovina por ano e quase 90% são importadas do Uruguai (ALVES et al., 2014). Há um crescente interesse por esse tipo de carne na alta gastronomia, representada por butiques de carne e restaurantes sofisticados. Aliado a isso, e decorrente da baixa oferta, fruto da menor disponibilidade de produtos importados, os preços pagos ao produtor pela carne de qualidade, especificamente de cordeiro, tem alcançado índices atrativos (REIS, 2011). A agregação de valor à pele de ovinos e caprinos é substancialmente mais elevada que aquela verificada para a carne e o leite destes animais. A pele de caprinos e em especial a de ovinos, apresentam boa cotação nos mercados interno e externo, em virtude da grande resistência, boa flexibilidade, podendo ser utilizadas para vestuário, calçados e luvas (LEITE, 2005). Tendo em vista que há perspectivas de um maior desenvolvimento no segmento de criação de pequenos ruminantes, porque o Brasil ainda importa a maior parte da carne consumida, é importante o combate às enfermidades que acometem e causam prejuízos à criação desses animais.

A linfadenite caseosa (LC) é uma importante enfermidade que afeta ovinos e caprinos, podendo acometer outras espécies de animais, inclusive humanos o que a torna uma potencial zoonose (MOURA-COSTA et al., 2008). A LC possui prevalência elevada em muitas partes do mundo e causa perdas econômicas significativas,

principalmente por causa da desclassificação e condenação das carcaças que se encontram infectadas ao abate e desvalorização da pele (BAIRD e FONTAINE, 2007).

O agente etiológico da doença é o bacilo Gram-positivo e intracelular facultativo *Corynebacterium pseudotuberculosis* (BATEY, 1986; BENHAM; SEAMAN; WOODBINE, 1962; CAMERON; MINNAAR, 1969; NOCARD, 1896). Essa bactéria pertence ao gênero *Corynebacterium* e está inserido no grupo dos actinomicetos, os quais fazem parte as bactérias dos gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*. Juntas, essas bactérias formam o grupo CMNR (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*). *C. pseudotuberculosis* pode infectar outros animais como bovinos, equinos e inclusive o homem (DORELLA et al., 2006).

As manifestações patológicas da LC caracterizam-se pela formação de abscessos contendo pus de cor amarelo-esverdeado e consistência tipo queijo coalho. A doença apresenta-se sob duas formas, a superficial e a visceral. Os abscessos localizam-se, inicialmente, nos linfonodos superficiais, podendo ser na região da mandíbula, abaixo da orelha, na escápula, no crural, e na região mamária. Apresenta-se, também, nos gânglios internos (mediastínicos, torácicos) e órgãos como os pulmões, o fígado e, em menor escala, no baço, na medula e no sistema reprodutivo (ALVES; SANTIAGO; PINHEIRO, 2007).

Corynebacterium pseudotuberculosis é um patógeno intracelular facultativo, que mesmo após a fagocitose pelos macrófagos e a fusão dos fagossomos com os lisossomos, consegue sobreviver e multiplicar dentro dos fagolisossomos e, principalmente ocasionar a morte destas células, levando a liberação de inúmeras bactérias vivas (MOTTA; CREMASCO; RIBEIRO, 2010). A disseminação deste microrganismo no animal hospedeiro ocorre a partir dos sítios linfáticos para os sítios secundários, como os linfonodos regionais e órgãos internos como o pulmão, onde se criam os abscessos secundários. Acredita-se que a bactéria utiliza a exotoxina hemolítica fosfolipase D (PLD) para disseminar a infecção. O período de incubação para a formação destes abscessos varia de dois a seis meses (ANDRADE et al., 2012; BILLINGTON et al., 2002; SMITH e SHERMAN, 2009). Mesmo assim, o estabelecimento da doença no animal é considerado um processo lento que pode durar meses, resultando assim, em uma doença de caráter crônico (ECKERSALL et al., 2007).

A transmissão da LC se dá principalmente pelas vias percutânea e pelas membranas de mucosas, através do contato de animais infectados com animais sadios. Em algumas criações o contágio pela via percutânea ocorre devido ao manejo inadequado do animal, causando-lhes múltiplas infecções através de ferimentos de tosquia, corte de cauda e marcação. Essa via também pode ser importante naturalmente, onde, por exemplo, a própria vegetação pode ocasionar lesões na pele e na mucosa oral dos animais. A infecção pode ser também adquirida através da inalação ou ingestão da bactéria (OREIBY, 2015; WILLIAMSON, 2001).

Embora *C. pseudotuberculosis* não se multiplique no meio ambiente, ela pode persistir por longos períodos após a supuração de um abscesso, tendo a sua sobrevivência aumentada para até oito semanas quando misturadas com partículas de madeira, palha e/ou fezes (ALVES; PINHEIRO; OLIVEIRA, 2004). Em solos ricos, úmidos e de baixas temperaturas, esta bactéria sobrevive por até oito meses, sendo, portanto, fonte de infecção e/ou reinfecção de animais sadios (RIZVI; GREEN; GLOVER, 1997).

A introdução de animais infectados em um rebanho sadio resulta no aparecimento de abscessos nesses animais ao longo de dois a três anos e a erradicação da doença torna-se mais difícil (ALVES; SANTIAGO; PINHEIRO, 2007), já que o diagnóstico geralmente se baseia na apresentação de sintomas clínicos (visualização de abscessos em linfonodos superficiais), o que acontece tardiamente, já estando esses animais infectados, possíveis disseminadores do patógeno (KIMBERLING, 1988; MOTTA; CREMASCO; RIBEIRO, 2010; PEKELDER, 2000; SOBRINHO, 2001).

A LC ocorre principalmente em regiões que apresentam intensa criação de ovinos e caprinos, como na Inglaterra, França, Holanda e Espanha, Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Canadá, Estados Unidos, Cuba, Venezuela e Brasil (ARSENAULT et al., 2003; BAIRD; FONTAINE, 2007; DORELLA et al., 2006; PATON et al., 2003; RUIZ et al., 2011; WILLIAMSON, 2001). As estimativas demonstram que a prevalência clínica seja de 30% no Brasil. Os Estados do nordeste brasileiro os mais afetados. Mesmo assim, na região sudeste, mais especificamente em Minas Gerais, que possui um rebanho reduzido, relatou-se 84,3% dos rebanhos de caprinos com LC (GUIMARÃES et al., 2011; RIBEIRO et al., 2001; SEYFFERT et al., 2010).

A ineficácia da terapia com drogas e a falha em seu diagnóstico clínico precoce torna difícil o controle da doença. Os testes de diagnóstico mais utilizados são: a cultura e o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA). A cultura é realizada pela coleta de material do abscesso e os testes de ELISA baseiam-se na detecção de anticorpos contra *C. pseudotuberculosis*. O ELISA mostrou-se eficiente na identificação precoce de animais infectados com este patógeno (DORELLA et al., 2006; SEYFFERT et al., 2010).

Existem formas de controlar a LC no rebanho, que consistem em drenar os abscessos e realizar a cauterização química com solução de iodo ou extirpar cirurgicamente o linfonodo superficial acometido. Deve-se ter cuidado para que o conteúdo purulento não contamine o ambiente pois essa é a principal fonte de disseminação da *C. pseudotuberculosis* entre os animais (HOLSTAD, 1985; NOZAKI; FARIA; MACHADO, 2000).

A vacinação do rebanho pode ser uma ferramenta importante na prevenção da LC. Uma vacina viva de *C. pseudotuberculosis*, naturalmente com baixa virulência obtida de uma amostra isolada de lesão característica de LC, foi lançada pela EBDA - Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola em maio de 2000, denominada de 1002, contra a LC de caprinos e ovinos, a qual foi autorizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento para produção e comercialização em todo o território nacional. Essa vacina foi testada a campo e em laboratório e apresentou uma eficiência de 83%. A imunização utilizando essa vacina pode ser feita somente após três meses de vida do animal, e a sua proteção é de um ano, devendo sua aplicação ser repetida anualmente (NASCIMENTO; COSTA; XIMENES, 2010; RIBEIRO et al., 1991).

1. Estudos em vacinas contra LC

A imunidade contra uma determinada doença infecciosa pode ser induzida por vários tipos de vacinas as quais encontram-se comercialmente disponíveis e são baseadas em microrganismos vivos atenuados e/ou inativados (vacinas de primeira geração), extratos de microrganismos e/ou proteínas recombinantes ou de subunidades (vacinas de segunda geração). Além das formas já disponíveis,

encontram-se em estágio experimental as vacinas à base de DNA (vacinas de terceira geração), e as que utilizam microrganismos vivos recombinantes. As vacinas comerciais disponíveis contra LC apresentam algumas desvantagens como baixa proteção, necessidade de revacinações periódicas, além de precisarem ser mantidas sob refrigeração (ABBAS; LICHTMAN, ANDREW H. PILLAI, 2011).

Na década de 60, na Argentina, foi desenvolvido o primeiro projeto de vacina contra LC. Neste projeto utilizou-se uma cultura de *C. pseudotuberculosis* formalizada e emulsificada em adjuvante de alumínio, onde obtiveram a redução de 60% da infecção. A exotoxina PLD foi testada como toxóide a 3% e foi capaz de diminuir a multiplicação e a propagação de *C. pseudotuberculosis* do local da infecção para outros órgãos, o que retardou o desenvolvimento da doença (ALVES e OLANDER, 1998; EGGLETON et al., 1991).

Umas das estratégias em estudos vacinais contra infecções bacterianas, é o desenvolvimento de bactérias vivas atenuadas ou mutantes por recombinação gênica. Isso é possível por meio da deleção de genes supostamente envolvidos na virulência do patógeno. Para isso, várias técnicas podem ser utilizadas como a expressão e transferência gênica, mutações aleatórias ou dirigidas e comparação gênica. A mais difundida a técnica de recombinação homóloga dupla para a obtenção de bactérias. Esse tipo de candidato vacinal pode produzir estímulos para a produção de citocinas, que é um fator importante em infecções bacterianas. As citocinas mais importantes que estimulam a resposta celular são a interleucina 12 (IL-12) e o interferon gamma (IFN γ), consideradas fundamentais contra bactérias intracelulares como a *C. pseudotuberculosis*. (HENSEL e HOLDEN, 1996).

Uma cepa mutante de *C. pseudotuberculosis* para o gene *aroQ* foi utilizada como vacina viva atenuada em ovelhas e, os resultados obtidos foram a diminuição da colonização nos linfonodos. No entanto, esta cepa atenuada não foi eficiente para ativar uma resposta imune capaz de proteger os animais da infecção com a cepa selvagem, levando apenas a uma diminuição da severidade clínica da doença (SIMMONS et al., 1998). A cepa mutante do gene *Xa2* (gene responsável por captação de ferro) de *C. pseudotuberculosis*, foi testada em caprinos para teste de virulência. Observou-se que não houve lesões nos linfonodos, sugerindo que a bactéria mutante para o gene *Xa2* não se desenvolveu no organismo devido à dificuldade de captar ferro para o seu metabolismo. Diante disso o gene *Xa2* está

relacionado com a virulência de *C. pseudotuberculosis* (BILLINGTON et al., 2002). Isso foi notado em outro estudo com uma cepa mutante para o gene *ciuA*, também responsável pela aquisição de ferro em *C. pseudotuberculosis*. Esse mutante quando inoculado em camundongos foi capaz de sobreviver nesses hospedeiros, sem causar danos, e ainda estimular a produção de anticorpos e citocinas (RIBEIRO et al., 2014).

A busca de novos antígenos pode gerar vacinas que sejam mais eficazes no controle da doença. Estudos recentes sobre o genoma de *C. pseudotuberculosis* e seus determinantes moleculares de virulência fornecem novas alternativas para o desenvolvimento de vacinas de DNA e subunidades (DORELLA et al., 2009). A vacina de DNA baseia-se no uso de sequências gênicas do agente patogênico que codificam antígenos imunodominantes. O processo de produção de vacinas de DNA inclui a clonagem de genes ou fragmentos destes relacionados à antigenicidade de um microrganismo em DNA plasmidial ou em vetores virais. Este plasmídeo é inserido em uma bactéria, geralmente *Escherichia coli*, por transformação bacteriana. A bactéria ao se replicar, permite que o plasmídeo se reproduza em larga escala, o que é fundamental para a produção da vacina. Quando administrados ao hospedeiro, esse DNA permite a produção da proteína antigênica pelas próprias células do hospedeiro vacinado e é capaz de induzir resposta imune específica celular e humoral com memória (GARG et al., 2014; SRIVASTAVA e LIU, 2003).

Uma vacina de DNA contra LC, em que o plasmídeo vacinal expressava a proteína de membrana PLD de *C. pseudotuberculosis*, modificada geneticamente para perder sua ação tóxica, junto ao domínio extracelular de bovinos CTLA-4, superou a resposta humoral das vacinas vivas atenuadas geneticamente (CHAPLIN et al., 1999). Outra vacina de DNA contra LC teve como foco a proteína produzida pelo gene *Hsp60*. Essa vacina foi testada em camundongos resultando no desenvolvimento de resposta humoral significativa (IgG1 e IgG2a), porém não suficiente para protegê-los contra a infecção (COSTA et al., 2011).

As vacinas de subunidade recombinante são produzidas a partir do gene de interesse. Geralmente são proteínas antigênicas que podem ser encontradas na membrana do patógeno ou serem secretadas. Um estudo realizado sobre vacina de subunidade contra *Mycobacterium tuberculosis* destaca que a produção desse tipo vacinal é mais direcionada por causa da expressão da proteína em laboratório em comparação à obtenção de misturas de proteínas a partir de lisado do patógeno. Há

também a diminuição das etapas de purificação da proteína de interesse, haja vista que realizar purificação a partir de lisado total torna-se um processo mais dificultoso para obter uma proteína adequada ao uso (OLSEN et al., 2001).

A vacina de subunidade quando administrada no hospedeiro torna-se um antígeno exógeno. A resposta imune inicia-se a partir da endocitose desse antígeno, por células apresentadoras de antígenos (APC's), que é complexado com moléculas do complexo de histocompatibilidade II (MHC de classe II) e apresentado na superfície das APC's para o reconhecimento e ativação de linfócitos T CD4 auxiliares. Testes com a proteína PLD recombinante de *C. pseudotuberculosis*, mas sem a sua ação tóxica, foram realizados e foi comprovado que essa proteína tem efeito protetor em ovinos. Outra proteína recombinante que obteve resultados favoráveis contra a LC experimental em camundongos foi a CP40. Quando usada como imunógeno essa proteína foi capaz de induzir uma resposta Th1 com ausência de resposta Th2 (HODGSON et al., 1994; KOWALCZYK; ERTL, 1999; NAGATA et al., 2004; SILVA et al., 2014).

2. Imunidade contra *C. pseudotuberculosis*

Para patógenos intracelulares, como é o caso da *C. pseudotuberculosis*, a resposta imune contra a infecção será do tipo celular e do tipo humoral, envolvendo dessa forma, processos reativos da resposta imune inata e adaptativa (ELLIS et al., 1991; LAN et al., 1998).

2.1. Resposta Imune Inata

Quando a bactéria entra no organismo do animal, em uma infecção primária, a resposta imune inata é a linha de defesa inicial. Nesse estágio, os neutrófilos e macrófagos são as principais células envolvidas para tentar controlar a infecção. Esses tipos celulares podem ser fundamentais para o estabelecimento de uma resposta protetora com relação à infecção primária, bem como à uma infecção

secundária, por serem células fagocíticas e possuírem habilidade em destruir o microrganismo (HARD, 1969; JOLLY, 1965a; LAN et al., 1999; NORTH, 1978). Mesmo com essa barreira inicial, *C. pseudotuberculosis* pode resistir à degradação dentro dos fagócitos e a partir disso causar a infecção crônica de difícil erradicação, o que é característico desta bactéria (STEFÁŃSKA et al., 2010; VAN CREVEL; OTTENHOFF; VAN DER MEER, 2003).

O papel dos neutrófilos é essencial na imunidade inata, pois eles controlam o crescimento bacteriano ou atuam diretamente, independente das ações dos macrófagos e células *Natural Killer* (NK), sobre as células infectadas. A restrição do crescimento bacteriano feita pelos neutrófilos é fundamental, pois se as bactérias aumentarem de número rapidamente, a formação da resposta imune adaptativa ficará prejudicada, o que torna difícil a erradicação da infecção (KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013).

A principal atuação dos macrófagos é na eliminação dos microrganismos fagocitados pelo uso do óxido nítrico (NO). O NO é um gás solúvel e lipofílico, sendo a enzima óxido nítrico sintetase (iNOS) sua sintetizadora. O estímulo para produção de NO pela iNOS parte da ação de citocinas pró-inflamatórias, como o interferon gama (INF- γ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). A ação do NO é citotóxica e citostática, desta forma o microrganismo é eliminado pela sua ligação com metais, como o ferro, presente nas enzimas do agente patogênico (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; JAMES, 1995; MACHADO et al., 2004; MEYER et al., 2005; MOORE et al., 2001; NATHAN; SHILOH, 2000; PÉPIN et al., 1992). Mesmo com o uso do NO para eliminar microrganismos, patógenos intracelulares facultativos, como *C. pseudotuberculosis*, podem escapar dos macrófagos por meio da utilização de antígenos específicos que resultam no bloqueio da produção desse gás (BOGDAN; NEWLANDS-MONTEITH; ELLIS, 1997; GREEN; NACY; MELTZER, 1991).

Citocinas pró-inflamatórias cumprem o papel de atrair neutrófilos e macrófagos para o local da infecção, bem como ativá-los. A interleucina 6 (IL-6) é uma dessas citocinas atuantes, e dentre suas funções está estimular os neutrófilos à proliferarem-se (APPELBERG et al., 1994; DIAS et al., 2011; LEAL et al., 1999). O TNF- α e a interleucina 1 alfa (IL-1 α) são as citocinas que causam o aumento da permeabilidade vascular, o que promove a passagem de macrófagos e neutrófilos para a área de infecção. Essas citocinas também promovem a ativação dessas células envolvidas na

resposta imune inata. O TNF- α também é um importante agente na formação de granuloma, pois atua como indutor de coagulação. O INF- γ além de estimular a produção de NO pelos macrófagos, induz os mesmos a expressarem moléculas que apresentam antígenos. Essas moléculas são conhecidas como complexo principal de histocompatibilidade das classes I e II (MHC das classes I e II), importantes na ativação de células na fase da resposta imune adaptativa (ALLIE et al., 2010; BRANDÃO et al., 2012; DIAS et al., 2011; NOLL e AUTENRIETH, 1996; PESTKA et al., 2004).

2.2. Resposta Imune Adaptativa

Contra *C. pseudotuberculosis* é necessário que a fagocitose seja eficiente para poder eliminá-la, antes que ela bloqueie a produção de NO e sobreviva dentro do fagócito. Para isso uma resposta imune adaptativa é importante para que haja um controle eficiente ou até mesmo a erradicação da infecção (BOGDAN; NEWLANDS-MONTEITH; ELLIS, 1997; GREEN; NACY; MELTZER, 1991; JOLLY, 1965b; LAN et al., 1998). O linfócito T CD8⁺ é uma das células que estão envolvidas na resposta imune adaptativa. O linfócito T CD8⁺ está relacionado com a atividade citotóxica, sendo um mecanismo de proteção antibacteriano, lisando macrófagos infectados por *C. pseudotuberculosis*. Ele é capaz de produzir também IFN- γ que estimula macrófagos a destruírem a bactéria fagocitada. Mas o maior responsável por montar a resposta imune adaptativa, frente a um microrganismo, é do linfócito T CD4⁺. Esse linfócito pode ser dividido em subpopulações de linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1) e do tipo 2 (Th2) (LAN et al., 1998).

A importância das células Th1 é que após sofrerem estímulo elas produzem diversas citocinas, dentre elas o IFN- γ , a interleucina 2 (IL-2) e o TNF- α . Essas citocinas atuam promovendo mecanismos efetores celulares, tais como a hipersensibilidade tardia e reações inflamatórias. Em camundongos essas citocinas promovem também a produção de anticorpos da classe IgG2a, que favorecem e potencializam, direta ou indiretamente, a opsonização e a toxicidade promovida por células. Esses mecanismos são fundamentais para o controle de bactérias intracelulares. Já as células Th2, quando estimuladas, secretam a interleucina 4 (IL-4) e a interleucina 5

(IL-5). A partir disso, essas citocinas estimulam células específicas a produzirem anticorpos IgE e, em camundongos, IgG1. Esses anticorpos atuam na imunidade humoral e reações alérgicas. É importante saber que além de todas essas funções, as células Th controlam uma a outra, ou seja a resposta de Th1 pode inibir a resposta de Th2 e vice-versa (COFFMAN, 2006; COTTREZ et al., 2000; HOFSTRA et al., 1998; MOSMANN et al., 1986).

A resposta gerada por células do tipo Th1 é tida como a mais eficiente contra bactérias intracelulares facultativas, que é uma característica da *C. pseudotuberculosis*, pois há um auxílio para o mecanismo da fagocitose, pelos macrófagos principalmente, e a eliminação da bactéria por conta da atuação do IFN- γ (KAUFMANN, 1993). Porém, não menos importante, a resposta imune gerada pelas células do tipo Th2 atuam na formação de granulomas e, especificamente contra *C. pseudotuberculosis*, na neutralização de exotoxina. A IL-4 ativa um tipo de macrófago que é reparador tecidual, ou seja, ele estimula fibroblastos que promovem a deposição de matriz extracelular para formar o granuloma. Além disso, ela também está envolvida na formação das células gigantes multinucleadas, que estão presentes em granulomas de *Mycobacterium tuberculosis*, e isso auxilia na contenção desta bactéria (MCINNIS e RENNICK, 1988). Lembrando que a resposta Th1 regula a Th2 e vice-versa, e levando em conta a formação de granulomas, por exemplo, sabe-se que o IFN- γ produzido por Th1, diminui ou pode impedir sua formação, isso caracteriza uma atividade antifibrótica eficiente. O processo antifibrótico do granuloma causado pela atuação do IFN- γ é caracterizado pelo estímulo de várias quimiocinas que reduzem a vascularização, causando assim a hipóxia do granuloma, resultando em necrose caseosa (EHLERS et al., 2001; WYNN, 2004).

Outra citocina que também está envolvida na regulação da resposta imune é a interleucina-10 (IL-10). Ela é produzida principalmente por células Th2 e possui efeitos anti-inflamatórios. Ela pode ser produzida também por células NK, monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e, quando há infecções crônicas, por células Th1. Entretanto a IL-10 é considerada pertencente ao perfil de células T regulatórias (Treg), assim como a interleucina 13 (IL-13) (CARTER et al., 2011; MOTOMURA et al., 2011). A IL-10 atua em fagócitos e em células apresentadoras de antígenos, favorecendo o bloqueio da produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e IL-12. Quando o TNF- α é inibido pela IL-10, a apoptose de macrófagos

infectados não ocorre, favorecendo assim a permanência da infecção crônica. Além disso, ela também inibe a expressão do MHC de classe II e a produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, o que diminui sistemicamente a resposta imune (FIORENTINO; BOND; MOSMANN, 1989; MOORE et al., 2001; OSWALD et al., 1992; ROJAS et al., 1999). A IL-10 atua também na regulação da formação de fibrose que gera o granuloma, assim como o IFN- γ . Ela interage com o IFN- γ e suprime a deposição de colágeno no tecido (MOSSER; EDWARDS, 2008; WYNN, 2004).

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. Estratégias para o desenvolvimento de vacinas. In: **Imunologia Celular e Molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2011. p. 361–362.
- ALLIE, N. et al. Limited role for lymphotoxin α in the host immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)**, v. 185, n. 7, p. 4292–4301, 2010.
- ALVES, F. S. F.; OLANDER, H. J. Uso de uma vacina toxoide no controle da linfadenite caseosa em caprinos. **Embrapa Caprinos**, 1998.
- ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; OLIVEIRA, A. A. DA F. **Implicações do uso de solução de formol em abscessos, para o controle da linfadenite caseosa**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2004.
- ALVES, F. S. F.; SANTIAGO, L. B.; PINHEIRO, R. R. **Linfadenite Caseosa: O Estado da Arte**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2007.
- ALVES, L. G. C. et al. Produção de carne ovina com foco no consumidor. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer**, v. 10, n. 18, p. 2399–2415, 2014.
- ANDRADE, J. S. L. et al. Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos e ovinos do semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 116–120, 2012.
- APPELBERG, R. et al. Role of interleukin-6 in the induction of protective T cells during *mycobacterial* infections in mice. **Immunology**, v. 82, n. 3, p. 361–364, 1994.
- ARSENAULT, J. et al. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 59, n. 1-2, p. 67–81, 2003.
- BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n. 4, p. 179–210, 2007.
- BATEY, R. G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, n. 9, p. 269–272, 1986.
- BENHAM, C. L.; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in diseases of animals. **The Veterinary Bulletin**, v. 32, p. 645–657, 1962.

BILLINGTON, S. J. et al. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 208, n. 1, p. 41–45, 2002.

BOGDAN, J. R.; NEWLANDS-MONTEITH, C. F.; ELLIS, J. A. Nitric oxide production following in vitro stimulation of ovine pulmonary alveolar macrophages. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, n. 3-4, p. 299–310, 1997.

BRANDÃO, A. P. M. S. et al. Host susceptibility to *Brucella abortus* infection is more pronounced in IFN- γ knockout than IL-12/ β 2-microglobulin double-deficient mice. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 4–11, 2012.

CAMERON, C. M.; MINNAAR, J. L. Immunization of mice against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 36, n. 2, p. 207–210, 1969.

CARTER, N. A et al. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)**, v. 186, n. 10, p. 5569–5579, 2011.

CHAPLIN, P. J. et al. Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 12, p. 6434–6438, 1999.

COFFMAN, R. L. Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. **Nature immunology**, v. 7, n. 6, p. 539–541, 2006.

COSTA, M. P. et al. 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**, v. 4, n. 1, p. 243, jan. 2011.

COSTA, R. G. et al. Caracterização do sistema de produção caprino e ovino na região semi-árida do Estado da Paraíba. Brasil. **Archivos de Zootecnia**, v. 57, n. 218, p. 195–205, 2008.

COTTREZ, F. et al. T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. **Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)**, v. 165, n. 9, p. 4848–4853, 2000.

DIAS, A. A S. O. et al. Strain-dependent arthritogenic potential of the zoonotic pathogen *Corynebacterium ulcerans*. **Veterinary Microbiology**, v. 153, n. 3-4, p. 323–331, 2011.

DORELLA, F. A. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology , biochemical properties , pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary research**, v. 37, p. 201–218, 2006.

DORELLA, F. A. et al. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. **Expert Review of Vaccines**, v. 8, p. 205–213, 2009.

DUSSE, L. M. S. A.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico; Nitric oxide revision. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343–350, 2003.

ECKERSALL, P. D. et al. Acute phase protein response in an experimental model of ovine caseous lymphadenitis. **BMC Veterinary Research**, v. 3, p. 35, jan. 2007.

EGGLETON, D. G. et al. Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. **Australian Veterinary Journal**, v. 68, p. 317–319, 1991.

EHLERS, S. et al. Alphabeta T cell receptor-positive cells and interferon-gamma, but not inducible nitric oxide synthase, are critical for granuloma necrosis in a mouse model of mycobacteria-induced pulmonary immunopathology. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 12, p. 1847–1859, 2001.

ELLIS, J. A et al. Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 28, n. 3-4, p. 303–316, 1991.

FIORENTINO, D. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 170, n. 6, p. 2081–2095, 1989.

GARG, N. K. et al. Development of novel carrier(s) mediated tuberculosis vaccine: More than a tour de force. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, p. 227–242, 2014.

GREEN, S. J.; NACY, C. A; MELTZER, M. S. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to *Leishmania* and other intracellular pathogens. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 50, n. 1, p. 93–103, 1991.

GUIMARÃES, A. S. et al. High sero-prevalence of caseous lymphadenitis identified in slaughterhouse samples as a consequence of deficiencies in sheep farm management in the state of Minas Gerais, Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 7, n. 1, p. 68, 2011.

HARD, G. C. Electron Microscopic Examination of *Corynebacterium ovis*. v. 97, n. 3, p. 1480–1485, 1969.

HENSEL, M.; HOLDEN, D. W. Molecular genetic approaches for the study of virulence in both pathogenic bacteria and fungi. **Microbiology**, v. 142 (Pt 5, n. 1 996, p. 1049–1058, 1996.

HODGSON, A L. et al. Protection of Sheep against Caseous Lymphadenitis by Use of a Single Oral Dose of Live Recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 12, p. 5275–5280, 1994.

HOFSTRA, C. L. et al. Prevention of Th2-Like cell responses by coadministration of IL-12 and IL-18 is associated with inhibition of antigen-induced airway hyperresponsiveness, eosinophilia, and serum IgE levels. **The Journal of Immunology**, v. 161, p. 5054–5060, 1998.

HOLSTAD, G. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats. IV. Course of the infection in two recently infected goat herds. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 27, n. 4, p. 609–616, 1985.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal - 2014. Efetivo dos rebanhos em 31.12 e variação anual, segundo as categorias - Brasil - 2013-2014**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2013/default_xls_brasil.shtm>. Acesso em: 17 set. 2015.

JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 4, p. 533–547, 1995.

JOLLY, R. D. The pathogenic action of the exotoxin of *Corynebacterium ovis*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 75, p. 417–431, 1965a.

JOLLY, R. D. Experimental infection of convalescent mice with *Corynebacterium ovis*. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 13, n. 6, p. 48–153, 1965b.

KAUFMANN, S. H. Immunity to intracellular bacteria. **Annual Review of Immunology**, v. 11, n. 1, p. 129–163, 1993.

KIMBERLING, C. V. Caseous lymphadenitis. In: **Jenson and Swift's Diseases of Sheep**. LEA & FEBIGER, p. 374–377, 1988.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews. Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–75, 2013.

KOWALCZYK, D. W.; ERTL, H. C. Immune responses to DNA vaccines. **Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS**, v. 55, n. 5, p. 751–770, 1999.

LAN, D. T. et al. Role of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Microbiology and Immunology**, v. 42, n. 12, p. 863–870, 1998.

LAN, D. T. et al. Tumor necrosis factor alpha and gamma interferon are required for the development of protective immunity to secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 61, n. 11, p. 1203–1208, 1999.

LEAL, I. S. et al. Interleukin-6 and interleukin-12 participate in induction of a type 1 protective T-cell response during vaccination with a tuberculosis subunit vaccine. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 11, p. 5747–5754, 1999.

LEITE, E. R. **O agronegócio das peles caprina e ovina**. Disponível em: <<http://hotsites.sct.embrapa.br/diacampo/programacao/2005/agronegocio-da-carne-e-da-pele-de-caprinos-e-ovinos>>. Acesso em: 10 set. 2015.

MACHADO, P. R. L. et al. Immune response mechanisms to infections. **Continuing Medical Education**, v. 79, n. 6, p. 647–664, 2004.

MCINNES, A.; RENNICK, D. M. Interleukin 4 induces cultured monocytes/macrophages to form giant multinucleated cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 167, p. 598–611, 1988.

MEYER, R. et al. In vitro IFN-gamma production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 107, n. 3-4, p. 249–254, 2005.

MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, n. 1, p. 683–765, 2001.

MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **The Journal of Immunology**, v. 136, n. 7, p. 2348–2357, 1986.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews. Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2008.

MOTOMURA, Y. et al. The transcription factor E4BP4 regulates the production of IL-10 and IL-13 in CD4⁺ T cells. **Nature Immunology**, v. 12, n. 5, p. 450–459, 2011.

MOTTA, R. G.; CREMASCO, A. DE C. M.; RIBEIRO, M. G. Infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em animais de produção. **Veterinária e Zootecnia**, v. 17, n. 2, p. 200–213, 2010.

MOURA-COSTA, L. F. et al. Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Canindé goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 126, n. 1-2, p. 131–141, 2008.

NAGATA, T. et al. Cytotoxic T-lymphocyte-, and helper T-lymphocyte-oriented DNA vaccination. **DNA and Cell Biology**, v. 23, n. 2, p. 93–106, 2004.

NASCIMENTO, J. L. S. DO; COSTA, L. S. D. A.; XIMENES, L. J. Atuação do Banco do Nordeste do Brasil em ciência e tecnologia na produção de Caprinos e ovinos no Nordeste do Brasil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, p. S1–S7, 2010.

NATHAN, C.; SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proceedings of**

the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 97, n. 16, p. 8841–8848, 2000.

NOCARD, E. Sur une lymphangite ulcereeuse simulant le farcin morveux chez le cheval. In: **Annales de l'Institut Pasteur**. p. 609, 1896.

NOLL, A.; AUTENRIETH, I. B. Immunity against *Yersinia enterocolitica* by vaccination with *Yersinia* HSP60 immunostimulating complexes or *Yersinia* HSP60 plus interleukin-12. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 8, p. 2955–2961, 1996.

NORTH, R. J. The Concept of the Activated Macrophage. **The Journal of Immunology**, v. 121, n. 3, p. 806–809, 1978.

NOZAKI, C. N.; FARIA, M. A. R.; MACHADO, T. M. M. Extirpação cirúrgica dos abscessos da linfadenite caseosa em caprinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 67, n. 2, p. 187–189, 2000.

OLSEN, A. W. et al. Protection of Mice with a Tuberculosis Subunit Vaccine Based on a Fusion Protein of Antigen 85B and ESAT-6. **Infection and immunity**, v. 69, n. 5, p. 2773–2778, 2001.

OREIBY, A. F. Diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goat. **Small Ruminant Research**, v. 123, n. 1, p. 160–166, 2015.

OSWALD, I. P. et al. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 18, p. 8676–8680, 1992.

PATON, M. W. et al. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. **Australian Veterinary Journal**, v. 81, n. 1-2, p. 91–5, 2003.

PEKELDER, J. J. Caseous lymphadenitis. In: MARTIN, W. B. . A. (Ed.). . **Diseases of Sheep**. 3. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2000. p. 270–274.

PÉPIN, M. et al. Ovine mononuclear phagocytes in situ: identification by monoclonal antibodies and involvement in experimental pyogranulomas. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 51, n. 2, p. 188–198, 1992.

PESTKA, S. et al. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 22, p. 929–979, 2004.

REIS, F. A. **Criação de ovelhas no Brasil Central : algumas considerações**. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/867935>>. Acesso em: 10 set. 2015.

RIBEIRO, D. et al. An iron-acquisition-deficient mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis* efficiently protects mice against challenge. **Veterinary Research**, v. 45, n. 1, p. 28, 2014.

RIBEIRO, M. G. et al. Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 1, p. 23–28, 2001.

RIBEIRO, O. C. et al. Dados preliminares sobre uma vacina viva contra a linfadenite caseosa.pdf. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 461–465, 1991.

RIZVI, S.; GREEN, L. E.; GLOVER, M. J. Caseous lymphadenitis: an increasing cause for concern. **The Veterinary Record**, v. 140, n. 22, p. 586–587, 1997.

ROJAS, M. et al. TNF-alpha and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. **Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)**, v. 162, n. 10, p. 6122–6131, 1999.

RUIZ, J. C. et al. Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. **PloS One**, v. 6, n. 4, p. e18551, jan. 2011.

SCHWAB, A. P. **Ovinocultura Made in Brazil**. Disponível em: <<http://www.paginarural.com.br/artigo/2242/ovincultura-made-in-brazil>>. Acesso em: 10 set. 2015.

SEYFFERT, N. et al. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Research in Veterinary Science**, v. 88, p. 50–55, 2010.

SILVA, J. W. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40 recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 1, p. 965, 2014.

SIMMONS, C. P. et al. Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 2, p. 474–479, 1998.

SMITH, M. C.; SHERMAN, D. M. **Subcutaneous Swellings. Goat Medicine**. 2. ed. Wiley-Blackwell, 2009.

SOBRINHO, A. G. S. Principais Enfermidades dos Ovinos. In: **Criação de ovinos** 2.ed. Jaboticabal: FUNEP (Ed.), p. 220–221, 2001.

SRIVASTAVA, I. K.; LIU, M. A. **Gene Vaccines** *Annals of Internal Medicine*, 2003.

STEFANÍSKA, I. et al. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* within macrophages and induction of phagocytes death. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 13, n. 1, p. 143–149, 2010.

VAN CREVEL, R.; OTTENHOFF, T. H. M.; VAN DER MEER, J. W. M. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 531, n. 2, p. 241–247, 2003.

WILLIAMSON, L. H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 17, n. 2, p. 359–71, vii, jul. 2001.

WYNN, T. A. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. **Nature reviews. Immunology**, v. 4, n. 8, p. 583–594, 2004.

ARTIGO 1
Normas da revista Plos One

**Identificação de novos antígenos de *Corynebacterium*
pseudotuberculosis por imunovarredura de uma biblioteca de
expressão gênica**

Cleber Eduardo Galvão¹, Stenio Perdigão Fragoso², Carina Elisei de Oliveira³, Odinéia Forner⁴, Renata Ribeiro Bastos Pereira¹, Cleber Oliveira Soares³, Grácia Maria Soares Rosinha^{3*}

¹ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande – MS, Brasil

² Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), Curitiba – PR, Brasil

³ Embrapa Gado de Corte – Sanidade Animal – Laboratório de Engenharia Genética Animal, Campo Grande – MS, Brasil

⁴ Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba – PR, Brasil

* Autor correspondente

E-mail: gracia.rosinha@embrapa.br

RESUMO

A linfadenite caseosa (LC) é uma enfermidade que afeta ovinos e caprinos e ocasionalmente o homem. O agente etiológico da doença é o bacilo *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Objetivou-se neste estudo construir uma biblioteca de expressão gênica de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e identificar, por imunovarredura,

genes que codificam proteínas antigênicas e imunogênicas para o desenvolvimento de testes de diagnóstico e vacinas contra LC, respectivamente. Uma cepa selvagem de *C. pseudotuberculosis* foi utilizada para a extração e digestão parcial do DNA genômico. Sequências entre 1,000 e 5,000 pares de bases foram cortadas do gel, purificadas e os fragmentos obtidos do DNA digerido foram ligados no vetor bacteriófago *ZAP Express*, empacotados em fagos e transfectados em *Escherichia coli*. Para a imunovarredura utilizou-se um *pool* de soros de ovinos positivos e um *pool* de soros negativos para LC. Na imunovarredura foram identificados quatro clones que reagiram fortemente aos soros. Os clones foram confirmados, após a realização da PCR e sequenciamento para comparação genômica de *C. pseudotuberculosis* no *GenBank*. Esses genes foram identificados, com identidade entre 99% e 100% e *E-value* de 0, como codificadores de proteínas de membrana. Proteínas desse tipo podem ser antigênicas, podendo favorecer o desenvolvimento de vacinas de subunidades ou de DNA contra LC, bem como o desenvolvimento de testes sorológicos para diagnóstico. O uso de imunovarredura de biblioteca de expressão gênica apresentou-se como uma técnica sensível e eficiente na identificação de prováveis genes imunodominantes.

Introdução

Corynebacterium pseudotuberculosis é um bacilo Gram-positivo e intracelular facultativo. Essa bactéria pertence à classe Actinobacteria, no qual estão inseridas outras bactérias do gênero *Corynebacterium* bem como as bactérias do gênero *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*. Essas bactérias formam o grupo CMNR, que é uma denominação dada de acordo com as letras iniciais dos gêneros dessas integrantes da classe Actinobacteria. A característica principal das bactérias do grupo CMNR é a composição e estrutura da parede celular, composta de peptidoglicano, arabinogalactano e ácido micólico, o que a torna mais densa e favorece a sobrevivência das mesmas dentro das células do hospedeiro [1].

A bactéria *C. pseudotuberculosis* é o agente etiológico da enfermidade linfadenite caseosa (LC), que afeta principalmente ovinos e caprinos. Há relatos de casos de LC transmitida ao homem após contato com animais acometidos pela doença [2]. Além da característica zoonótica, outro fator importante e que impulsiona pesquisas voltadas para LC é que esta causa perdas econômicas na produção de ovinos e caprinos. Esta infecção apresenta-se de forma crônica e, por vezes, sub-clínica, o que torna difícil seu diagnóstico e controle. A patogenese da LC é um processo lento, resultando em uma doença de caráter crônico [3]. Em geral as infecções são originadas nos gânglios linfáticos, porém, pela disseminação da exotoxina hemolítica fosfolipase D (PLD) pode se tornar sistêmica, levando a infecção de outros órgãos [4].

A LC é de difícil erradicação, por seu diagnóstico geralmente se basear na apresentação de sintomas clínicos (visualização de abscessos em linfonodos superficiais), o que acontece tardiamente. Desta forma, o animal infectado torna-se

um provável disseminador do patógeno [5–7]. A ineficácia da terapia com drogas e a falha em seu diagnóstico clínico precoce torna difícil o controle da doença [8]. Os testes de diagnósticos mais utilizados são: cultura bacteriana e ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA). A cultura é realizada pela coleta de material do abscesso e cultivo em meio de crescimento específico para *C. pseudotuberculosis*. Os testes de ELISA baseiam-se na detecção de anticorpos contra *C. pseudotuberculosis* e mostram-se eficiente na identificação precoce de animais infectados com este patógeno [9].

A profilaxia e controle da LC podem ser realizados pela drenagem dos linfonodos superficiais acometidos ou extirpação cirúrgica dos mesmos. Outro método é a vacinação do rebanho. Há no mercado vacinas compostas de combinações de antígenos contra outros patógenos e *C. pseudotuberculosis*, sendo a proteína PLD, usada nessa mesma formulação, como toxóide contra a LC [10–13]. Há uma formulação vacinal específica contra LC que é composta pela *C. pseudotuberculosis* viva naturalmente atenuada. Essa vacina foi desenvolvida no Brasil pela Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA) e é conhecida como 1002 (nome obtido a partir da cepa de *C. pseudotuberculosis* 1002). Essa vacina confere proteção de 83% segundo um estudo realizado [14].

Por haver poucas opções de vacinas para a prevenção e controle da LC, alguns estudos buscam desenvolver outras formulações vacinais, principalmente baseadas em genes (vacina de DNA) ou em proteínas (vacina de subunidade) da bactéria. Um exemplo disso é um estudo realizado com o gene que codifica uma proteína de choque térmico, ou chaperona, do grupo 60 (*Hsp60*) de *C. pseudotuberculosis*, em que foram testadas as vacinas de DNA e de subunidade desse gene contra a LC experimental [15,16]. É possível desenvolver outro tipo de formulação vacinal, com cepas

atenuadas por *knockout* de genes. Um estudo recente utilizou uma cepa atenuada de *C. pseudotuberculosis* com *knockout* para o gene *ciuA* (gene envolvido no transporte citrato de ferro para o metabolismo da bactéria), que induziu tanto resposta celular como humoral após desafio com cepa selvagem [17].

Para desenvolver vacinas, sejam elas de DNA, atenuadas por mutação ou de subunidades, são necessários estudos voltados para identificação de genes relacionados com a virulência da bactéria. Estudos recentes sobre o genoma de *C. pseudotuberculosis* e seus determinantes moleculares de virulência fornecem novas alternativas para identificar genes que codificam possíveis proteínas antigênicas, ou seja, são genes que podem ser alvo de estudos para formulações vacinais [18]. Uma das técnicas disponíveis para identificar potenciais antígenos, é a imunovarredura de bibliotecas genômicas ou de expressão gênica. Para identificar genes que expressam proteínas antigênicas é necessário o uso de soro de indivíduos positivos clinicamente para determinada doença [19–22].

Considerando as pesquisas anteriores para a prevenção e controle da LC e os estudos em busca de genes imunodominantes de *C. pseudotuberculosis*, acredita-se que a técnica de imunovarredura de biblioteca de expressão gênica, é eficaz na seleção de clones que expressam proteínas imunogênicas. A identificação de novos antígenos pode oferecer benefícios e aplicações potenciais no desenvolvimento de vacinas e até mesmo na formulação de novas ferramentas de diagnóstico para identificação de *C. pseudotuberculosis*, em amostras de ovinos e caprinos. A descoberta das propriedades antigênicas das proteínas pode auxiliar na compreensão geral da patogenicidade, bem como entender os fatores relacionados à virulência da bactéria.

Neste estudo objetivou-se identificar e isolar por imunovarredura, genes que codificam proteínas antigênicas e imunogênicas para o desenvolvimento de testes de diagnóstico e vacinas contra LC, respectivamente. Após a imunovarredura, foram selecionados os clones que reagiram com os soros de ovinos positivos para LC. Os genes de *C. pseudotuberculosis*, clonados em vetor de expressão, foram extraídos de cada clone e amplificados por PCR para a realização do sequenciamento. As sequências dos genes foram comparadas com as sequências de *C. pseudotuberculosis* depositadas no *GenBank*, no que resultou na identificação dos genes e suas respectivas proteínas antigênicas. Esse estudo foi modelado para analisar a adequação dos genes identificados para futuras aplicações no desenvolvimento de formulações vacinais de DNA e de subunidade, bem como ferramentas de diagnóstico para LC.

Materiais e Métodos

Amostras bacterianas

Foi utilizada uma amostra de *C. pseudotuberculosis*, coletada diretamente de abscesso de ovino oriundo do nordeste do Brasil. As amostras de *Escherichia coli* utilizadas foram XL1-Blue MRF' e Y1090.

Extração do DNA genômico de *C. pseudotuberculosis*

Para a extração do DNA genômico foi utilizado um protocolo adaptado [23]. Foram centrifugados 2 mL de cultura de *C. pseudotuberculosis* crescida durante 72 horas a 13000 rpm por 10 minutos. Os *pellets* foram lavados uma vez e ressuspensos em 0,8 mL de TE Buffer (Tris-HCl 10 mM pH=7,0, EDTA 10 mM pH=8,0) com 10,3% de glicose, 8 mg de lisozima e deixados *overnight* a 37°C sob agitação constante (200 rpm). Após, foi adicionado às amostras 100 µL de SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio), 20 µL de proteinase K 20% e estas foram vortexadas levemente e incubadas em banho-maria a 56°C durante 5 horas. Em seguida foi adicionado um volume igual de fenol e os tubos ficaram agitando por 1 hora em agitador orbital. Os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos onde o último passo foi repetido novamente.

Posteriormente, foi adicionado um volume igual de fenol-clorofórmio e os tubos foram agitados por 10 minutos na mão, sendo depois centrifugados sob as mesmas condições anteriores. Este passo foi novamente repetido e à fase aquosa recuperada foi adicionado um volume igual de fenol-clorofórmio:álcool-isoamílico, com os mesmos procedimentos anteriores descritos. Para a precipitação do DNA foi adicionado 0,6 volumes de isopropanol e os tubos foram centrifugados sob as mesmas condições anteriores. Posteriormente, os *pellets* foram lavados com etanol 70% e colocados sob a bancada para secagem. Os *pellets* foram ressuspensos em 50 µL de água milli-Q livre de endonucleases e tratados com RNase por 30 minutos a 37°C. Os DNAs foram congelados a – 20°C até a sua utilização.

A pureza do DNA total das amostras foi verificada por meio de corrida eletroforética em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídeo e analisado

sob luz ultravioleta em transiluminador e fotografado em câmara digital. A obtenção da concentração foi realizada em dosagem no espectrofotômetro (Gene Quant®), utilizando-se os comprimentos de onda 230, 260 e 280 nm.

Digestão enzimática parcial do DNA genômico de *C. pseudotuberculosis*

Cerca de 1 µg de DNA genômico de *C. pseudotuberculosis* foi utilizado para cada reação de digestão parcial com a enzima *Sau 3AI* a 0.7 U/µL. As reações foram submetidas à corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% e corado em brometo de etídeo. Após realizou-se o corte das bandas de DNA na altura de 1,000 a 5,000 pb e estas foram purificadas com o kit QUIAEX II (Quiagen®).

Os produtos das digestões e purificação foram avaliados mediante corridas eletroforéticas em gel de agarose a 0,8%, e corado em brometo de etídeo. Os tamanhos dos fragmentos foram verificados e estimados por comparação com o marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen®).

Ligação dos insertos ao vetor λ ZAP Express e empacotamento da reação

O DNA purificado foi dosado e ligado ao vetor λ Zap Express de acordo com a seguinte reação: 1 µg de λ ZAP Express; 200 ng de inserto; 0,5 µL de tampão da ligase 10x; 2 U de ligase. Quatro microlitros da ligação foram adicionados ao extrato de encapsidação *Gigapack gold plus* (Stratagene®). Em seguida o material foi incubado por 2 horas à temperatura ambiente. Após esse tempo foram adicionados

500 µL de tampão SM (5,8 g de NaCl, 2 g de MgSO₄.H₂O, 50 mL de Tris-HCl pH 7,5, 5 mL de 2% de gelatina), seguidos de 20 µL de clorofórmio. A mistura foi centrifugada para remoção de debris e armazenada a 4°C.

Cultivo de *E. coli* XL1-Blue MRF' para transfecção

Uma colônia de *E. coli* XL1-Blue MRF' foi cultivada em meio LB suplementado com tetraciclina (12,5 µg/mL). A cultura foi incubada a 30 °C durante 16 horas (DO aprox. de 1). Após esse tempo as bactérias foram coletadas por centrifugação a 1000 x g por 10 minutos a 4°C, e ressuspendidas em 5 mL de tampão SM.

As bactérias em tampão SM foram diluídas utilizando o mesmo tampão até OD de 0,5 e usadas imediatamente para determinação do título da reação de empacotamento nas seguintes condições: 200 µL de bactérias + 1 µL da diluição 1/10 da reação de empacotamento (1 µL da reação de empacotamento + 9 µL de SM).

A suspensão foi incubada à 37°C por 15 min, sem agitação. Quatro mL de top NZY Ágar aquecido a 45°C foram adicionados à suspensão bacteriana e imediatamente vertidos sobre placa contendo meio NZY sólido acrescido de IPTG e X-Gal, previamente aquecidas a 37°C. A placa foi incubada a 37°C por 16 horas.

Amplificação da biblioteca

Uma colônia de *E. coli* XL1-Blue MRF' foi cultivada em 50 mL de meio LB suplementado com tetraciclina (12,5 µg/mL), maltose (0,2%) e MgSO₄ (10 mM). A

cultura foi incubada a 37°C até DO de 1. Após, as bactérias foram coletadas por centrifugação a 1000 xg por 10 minutos, a 4°C, ressuspendidas em 25 mL de tampão SM e mantidas a 4°C até a sua utilização. Quatro mL da suspensão bacteriana foi diluída com tampão SM para DO de 0,5 (volume final 4 mL). Alíquotas de 600 µL de células diluídas foram incubadas a 37°C por 15 minutos com 125 µL de células transfectadas (aproximadamente 5×10^4 UFC) em tubo falcon de 50 mL. Para amplificar toda a biblioteca foram feitas quatro alíquotas.

Quatro mL de top NZY Ágar aquecido a 42°C foram adicionados a cada suspensão bacteriana, misturados por inversão (2 vezes) e imediatamente vertidos sobre placa de 400 cm² (20 cm x 20 cm) contendo meio NZY sólido, previamente aquecida a 37°C. As quatro placas foram incubadas a 37°C por 16 horas. Após a incubação, 20 mL de tampão SM estéril foram adicionados sobre as placas, que foram mantidas por agitação suave durante 4 horas à temperatura ambiente, permitindo a difusão dos fagos para o SM.

A suspensão de fagos foi coletada de cada placa e colocada em tubos de centrífuga. O lisado foi clarificado por centrifugação a 5,000 x g por 10 minutos, para remoção dos debris celulares. O lisado clarificado foi armazenado em frasco de vidro com a adição de 0,3% de clorofórmio e mantido a 4°C. O título da biblioteca amplificada foi determinado por meio de diluições seriadas.

PCR da biblioteca

Com o objetivo de verificar se haviam fragmentos de DNA de *C. pseudotuberculosis* na biblioteca foi realizada a reação em cadeia de polimerase

(PCR) para certificação. Para isso utilizou-se *primers* específicos para o gene *pld* de *C. pseudotuberculosis* em uma reação contendo toda a biblioteca, com o objetivo de identificar se este gene estava presente na mesma. Os *primers* utilizados foram os seguintes: pIDcoryF (5' – ATG AGG GAG AAA GTT GTT TTA – 3') e pIDcoryR (5' – TCA CCA CGG GTT ATC CGC – 3').

O gene *pld* foi amplificado em reação com volume final de 50 µL, contendo: 5 µL de tampão (1X), 1,5 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 2 µL de *primer forward* pIDcoryF (20 pmol), 2 µL de *primer reverse* pIDcoryR (20 pmol); 1 µL de dNTP (10 mM); 37 µL de água ultrapura; 0,5 U/ µL de Taq DNA polimerase; e 1 µL de DNA genômico de *C. pseudotuberculosis*. A amplificação ocorreu em termociclador, onde a temperatura inicial foi de 95°C, a desnaturação da dupla fita à 95°C por 4 minutos, logo após, o anelamento dos *primers* à 55°C por 1 minutos, extensão da fita de DNA à 72°C por 2 minutos. Os ciclos foram repetidos 35 vezes, com extensão à 72°C por 7 minutos e finalizado à 4°C.

Amostras de soros de animais positivos para LC

Foram selecionados soros sanguíneos de ovinos com sinais clínicos da LC. Esses soros pertencem ao banco de soros da Embrapa Gado de Corte, e foram previamente analisados com o teste de ELISA (dados de títulos sorológicos não mostrados). Dois soros (s.1 e s.2) com altos títulos de anticorpos contra *C. pseudotuberculosis* foram selecionados como soros positivos para a imunovarredura. Cinco soros (s.3, s.4, s.5, s.6 e s.7) com titulação média, mas considerados positivos para LC, foram selecionados para formar um *pool* de amostras sorológicas. Um soro

(sn) que não obteve títulos de anticorpos contra LC, e que foi obtido de um animal sem sinais clínicos da doença, foi selecionado como soro controle negativo para imunovarredura.

Obtenção de soros livres de contaminantes de antígenos de *E. coli* e antígenos do fago

O objetivo foi limpar o máximo possível todos os soros de contaminantes de antígenos de *E. coli* que poderiam interferir na imunovarredura da biblioteca. Foram preparados extratos de antígeno bruto de *C. pseudotuberculosis* e *E. coli* XL1-Blue e dosados pelo método de Bradford.

Para preparar a coluna de sepharose, pesou-se 330 mg de sepharose e adicionou-se a 1 mL de HCL 1mM. Posteriormente a resina foi lavada com aproximadamente 70 mL de HCl 1mM, homogeneizada e aplicou-se vácuo para retirada do líquido. Adicionou-se à coluna 5 mL de antígeno sonificado de *E. coli* previamente diluído em tampão de acoplamento (NaHCO_3 0,1M, NaCl 0,5M pH 8.3). Incubou-se por 60 min, sob leve agitação, a temperatura ambiente. A resina foi lavada com tampão de acoplamento com 5 vezes o seu volume. Realizou-se o bloqueio com Tris 0,1M pH 8,0 por 2 horas. Posteriormente lavou-se alternadamente 3 vezes com NaAc 0,1 M–NaCl 0,5 M pH 4,0 e Tris 0,1 M–NaCl 0,5 M pH 8,0. Lavou-se com 10 mL de PBS e adicionou-se 5 mL de soro positivo para *C. pseudotuberculosis*. Incubou-se à 4°C por 16 horas sob agitação. Coletou-se o soro em gelo e lavou-se a resina com 1 mL de tampão de acoplamento.

A eluição dos anticorpos presos a coluna, foi realizada com frações de 1 mL de glicina 0,1 M pH 2,4. A esse material eluído aplicou-se imediatamente 30 µL de Tris 3 M pH 8,8 e 20 µL de NaCl 5 M. Lavou-se a resina com glicina 0,1M pH 2,4 e posteriormente com tampão de acoplamento. Repetiu-se este protocolo 6 vezes com o mesmo soro a fim de se obter melhores resultados.

Foi realizada mais uma limpeza de soro ovino contra *E. coli* junto com o fago a partir do lisado Fago/*E. coli*. Utilizou-se um fago (λ gT11) sem inserto e uma cepa de *E. coli* Y1090. A partir de 100 µL de uma cultura de *E. coli* (Y1090) com DO próxima a 1, foi adicionado 5 µL do fago (λ gT11) e incubado a 37°C por 15 minutos, em seguida esse volume total foi colocado em um tubo de *soft* ágar (65°C) e imediatamente vertido sobre uma placa com meio NZY que foi incubado por aproximadamente 5 horas, até que aparecessem plaques. Como o objetivo era uma placa de lise confluência, os poucos plaques visualizados na placa foram isolados, eluídos em tampão SM, centrifugados e o sobrenadante coletado para realizar o mesmo procedimento acima descrito.

Após ter obtido a placa de lise confluência, foi colocada uma membrana de nitrocelulose sobre essa placa por 2 minutos. Essa membrana sensibilizada com o lisado foi usada para a limpeza dos soros positivos e do soro controle negativo. Cada soro diluído 1:100 foi passado em 5 membranas.

Análise dos soros limpos

A avaliação sorológica foi realizada por meio do teste de *Western blotting*, com todos os soros. Para isso foi realizada eletroforese vertical em gel de poliacrilamida

12% usando preparados antigênicos de *C. pseudotuberculosis* e *E. coli* para a detecção da diferença entre os padrões de bandas das proteínas dos dois microrganismos. As proteínas presentes foram visualizadas no gel corado com azul de Coomassie R-250.

O *Western blotting* foi realizado com os extratos antigênicos sonicados de *C. pseudotuberculosis* e *E. coli*, separadamente, para a análise do perfil de reconhecimento antigênico das bandas proteicas. Como anticorpo primário utilizou-se os soros dos animais naturalmente infectados por *C. pseudotuberculosis* na diluição 1:100 em PBS-T 20, e incubação da membrana durante uma hora. A seguir, foram incubadas, durante uma hora, com anticorpo anti *goat*-IgG, conjugado à fosfatase alcalina, diluído a 1:7000 em PBS-T 20. A revelação das bandas foi realizada com cloreto de nitro-blue-tetrazólio (NBT) - sal de 5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato, 4-toluidina (BCIP), dissolvida em tampão de fosfatase (Tris-Base 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM).

Imunovarredura da biblioteca de expressão

Após a confirmação de que os soros dos animais minimizaram o reconhecimento de antígenos de *E. coli*, a imunovarredura da biblioteca de expressão de *C. pseudotuberculosis* foi realizada a partir dos soros positivos e negativo para LC selecionados.

A imunovarredura foi realizada a partir de uma diluição de 10^{-4} da biblioteca de expressão de *C. pseudotuberculosis* (4×10^8 UFC), onde 100 μ L dos fagos recombinantes foram incubados por 15 minutos à 37 °C com 150 μ L de uma cultura

bacteriana de *E. coli* (XL1Blue) com DO= 1. Em seguida, a essa mistura foram adicionados 4 mL de *soft* ágar pré-aquecido à 42°C e vertidos imediatamente sobre uma placa de LB contendo 10 mM de MgSO₄. Para cada soro positivo foram preparadas seis placas de lise com 2x10³ UFC/placa e uma única placa foi usada para o soro controle negativo. As placas foram incubadas à 37°C durante a noite e, no dia seguinte foi colocado sobre cada placa uma membrana de nitrocelulose embebida com IPTG 10 mM.

Para marcar o posicionamento das membranas, foram realizadas perfurações com agulhas e as placas foram incubadas por 4 horas à 37°C. Em seguida, as membranas foram retiradas com o auxílio de uma pinça e bloqueadas em leite desnatado 5% diluído em TBS-T (20 mM Tris pH 7,4, 120 mM NaCl e 0,05% de Tween 20) e após 3 lavagens sucessivas com TBS-T, as membranas foram incubadas com os soros de ovinos diluídos a 1:1,500 por 1 hora sob agitação e em temperatura ambiente. Após três lavagens com TBS-T, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário, conjugado com fosfatase alcalina, diluído 1:7,000 em TBS-T por 1 hora. A revelação foi realizada com uma solução de NBT/BCIP diluída em tampão fosfato por 15 minutos. Como controles, foram realizadas varreduras utilizando soro negativo para *C. pseudotuberculosis* e varreduras utilizando o bacteriófago λ Zap Express vazio (não recombinante). Posteriormente foi realizado um imuno *dot* para verificar se todos os clones reagem com todos os soros testados na imunovarredura.

Seleção de clones positivos

Os clones que apresentaram sinal imunorreativo foram retirados das placas com uma área de segurança (aproximadamente 0,5 cm de diâmetro) usando uma pipeta pasteur. Os fragmentos de *soft* ágar contendo os clones positivos foram colocados separadamente em tubos de microcentrífuga com 250 µL de tampão SM. Cada tubo foi agitado em vórtex para liberar as partículas de fago recombinante no tampão SM. Os tubos contendo os fagos foram estocados a -20°C.

Amplificação por PCR dos insertos clonados no vetor λ Zap Express

Os insertos de DNA, dos clones positivos, presentes nos fagos recombinantes, foram amplificados por PCR com os *primers* do λ Zap Express: ZAPF (5' GTA AAA CGA CGG CCA GTG AAT TGT AAT ACA - 3') e ZAPR: (5'- TGA TTA CGC CAA GCT CGA AAT TAA CCC TCA CTA AA - 3'), dNTPs 0,2 mM, tampão da Taq DNA polimerase, MgCl₂ 1,5 mM e Taq DNA polimerase 0,5 U. A reação foi submetida a uma etapa de desnaturação à 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 30 segundos, hibridização dos iniciadores à 54°C por 30 segundos e extensão à 72°C por 4 minutos.

Os fragmentos amplificados foram purificados e posteriormente clonados em vetor pGEM-T easy (Promega®). Os plasmídeos recombinantes foram purificados usando o kit Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen®). As sequências dos clones recombinantes foram analisadas por comparação com as sequências do *GenBank* utilizando o algoritmo *BLAST* e os *softwares* Bio Edit e *Vector NTI* 11. As sequências

foram também traduzidas em sequências de aminoácidos gerando assim, o fragmento da proteína correspondente. Após, as sequências traduzidas em proteínas foram analisadas para verificar tamanho e peso molecular com o auxílio dos *softwares* Bio Edit e *Vector NTI* 11.

Resultados

Digestão parcial do DNA genômico de *C. pseudotuberculosis* e ligação dos insertos ao vetor λ ZAP Express

A digestão parcial do DNA de *C. pseudotuberculosis* com a enzima *Sau 3AI* foi eficiente. Os fragmentos compreendidos entre 1,000 e 5,000 pares de bases (pb) foram utilizados para a construção da biblioteca, após a purificação. Observou-se em gel de agarose 0,8%, a efetiva ligação dos insertos no vetor.

Transfecção e titulação da reação de empacotamento do fago (UFC/mL)

O número de unidades formadoras de colônias (UFC) obtido no plaqueamento da reação de empacotamento (diluição de 1/10) foi de 48. Desta forma procedeu-se o cálculo para titulação da seguinte maneira: $48 \text{ UFC} \times 10 \text{ (fator de diluição)} \times 500 \text{ }\mu\text{L}$ (volume da reação de empacotamento) = 240,000 UFC em 500 μL , ou seja, 480,000 UFC/mL.

O total de plaques azuis (fago nativo) na placa contendo a diluição de 1/10 = 10 plaques (aproximadamente 20% do total). Isso significa que no total de 240,000 plaques, aproximadamente 48,000 eram fagos não recombinantes. O tamanho médio dos insertos clonados foi de 3 kb, então obteve-se no total de fagos recombinantes: $240,000 - 48,000 = 192,000$ fagos (80% de eficiência), uma representação do genoma de: $3 \text{ kb} \times 192,000 = 576,000 \text{ kb}$, ou seja, $5,76 \times 10^8 \text{ pb}$. Isso significa uma cobertura do genoma superior a 10 vezes, o que é considerado excelente. Após a execução dos passos da amplificação o título obtido para a biblioteca foi de $7 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$.

PCR para certificação da biblioteca

Na Figura 1, o produto amplificado corresponde a 924 pb do gene *pId*, confirmando a presença deste gene na biblioteca de expressão de *C. pseudotuberculosis*.

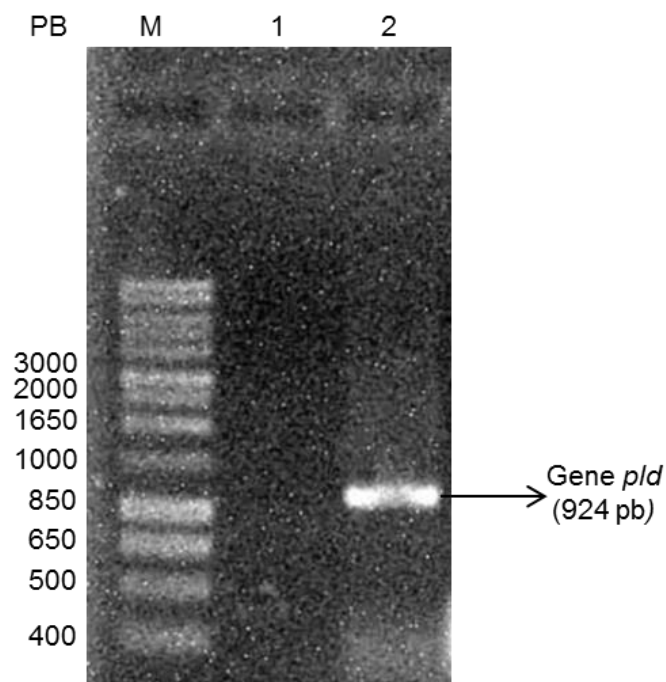


Figura 1. PCR da biblioteca de *C. pseudotuberculosis*. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio. M - Perfil eletroforético do padrão de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®); 1 - Controle negativo da reação de PCR; 2 - Produto da PCR da biblioteca utilizando-se os *primers* do gene *pld*.

Análise dos soros

Os extratos brutos de *E. coli* e *C. pseudotuberculosis* foram obtidos na concentração de 1,27 mg/mL e 0,059 mg/mL, respectivamente. Foram analisados soros dos animais com a finalidade de selecionar os que apresentassem as melhores respostas de reconhecimento ao extrato bruto de *C. pseudotuberculosis*, para serem utilizados na imunovarredura da biblioteca. Foi realizada a eletroforese vertical em gel de poliacrilamida dos preparados antigênicos de *C. pseudotuberculosis* e *E. coli* para a detecção da diferença entre os padrões de bandas das proteínas dos dois organismos.

Para avaliar o resultado da limpeza dos soros, foi realizado *western blotting*, testando a reação de membranas sensibilizadas com extrato de *E. coli* e de *C. pseudotuberculosis*, separadamente, com soros limpos e não limpos. Observou-se que houve reação de anticorpos específicos para *C. pseudotuberculosis* pela visualização de bandas. Houve diminuição da reação de anticorpos específicos para *E. coli*, devido às lavagens desse soros, onde não foram observadas formações de bandas.

Imunovarredura da biblioteca genômica de *C. pseudotuberculosis*

Foram identificados um total de quatro clones positivos em contraste com o controle negativo. No teste de imuno *dot* foram utilizados os soros positivos s.1 e s.2, o *pool* de soros considerados positivos (s.3, s.4, s.5, s.6 e s.7), que reagiram com os quatro clones. Não houve reação com o soro negativo (sn) e com o controle vetor λ Zap Express sem inserto.

Amplificação dos insertos clonados no vetor λ Zap Express

Os quatro clones amplificaram com os *primers* ZAPF e ZAPR, gerando fragmentos entre 2 e 3 Kb, que foram visualizados em gel de agarose 0,8% (Figura 2).

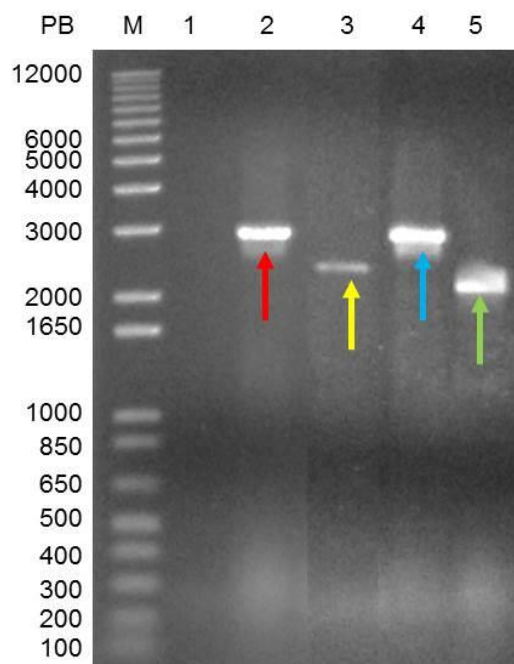


Figura 2. Amplificação dos insertos clonados no vetor λ Zap Express. Gel de agarose 0,8% mostrando os produtos de PCR amplificados (*primers* ZAPF e ZAPR). M - Perfil eletroforético do padrão de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®); 1 – Controle negativo da reação; 2 - Clone 1 (seta vermelha); 3 - Clone 2 (seta amarela); 4 – Clone 3 (seta azul); 5 – Clone 4 (seta verde).

Obtenção da sequência dos genes codificadores das proteínas antigênicas para *C. pseudotuberculosis*

Os fragmentos amplificados foram identificados por sequenciamento e revelaram pertencer ao genoma da bactéria *C. pseudotuberculosis* (Tabela 1). Os fragmentos correspondentes aos genes identificados no sequenciamento não correspondem ao tamanho total de cada gene. Entretanto, o tamanho real de cada gene e a posição no genoma da bactéria podem ser visualizados na tabela 1. O esquema da ordem desses genes no genoma de *C. pseudotuberculosis* está esquematizado na figura 3.

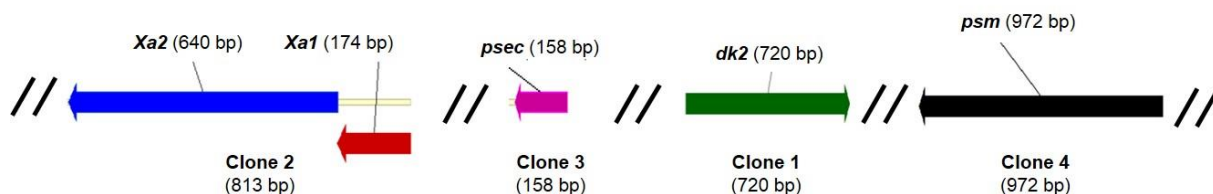


Figura 3. Ordem no genoma de *C. pseudotuberculosis* dos genes identificados no sequenciamento. Esquema representando a ordem dos genes no genoma de *C. pseudotuberculosis* que foram identificados no sequenciamento, originados dos clones reativos na imunovarredura da biblioteca. A ordem foi determinada de acordo com a análise a partir do *GenBank* com acesso CP001829. A quantidade de pares de bases entre parênteses corresponde ao tamanho do fragmento clonado e sequenciado, não correspondendo ao tamanho total dos genes. As barras paralelas (em preto) indicam a presença de mais genes antes, depois e entre os genes identificados.

Foi possível alinhar, usando o programa *Bio Edit*, as sequências obtidas de cada gene com as sequências de genes de diferentes cepas de *C. pseudotuberculosis*, e em alguns casos foi possível alinhar também com sequências de genes de *Corynebacterium ulcerans*. Todas as sequências das diferentes cepas foram obtidas do *GenBank*. Observou-se que os fragmentos sequenciados dos genes *dk2* e *Xa1* são conservados entre as diferentes cepas de *C. pseudotuberculosis*. O gene *Xa2* e o gene *psm* são conservados entre as diferentes cepas de *C. pseudotuberculosis* mas possuem diferenças nas sequências de nucleotídeos entre três diferentes cepas de *C. ulcerans*. Somente o gene *psec* possui a sequência de nucleotídeos bem conservada entre as cepas de *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans*.

Com o auxílio do programa *Bio Edit*, foi possível traduzir os fragmentos de cada gene em sequências de aminoácidos, o que nos forneceu parte das proteínas sintetizadas por cada gene. As sequências das cepas do *GenBank* foram traduzidas também. Após as traduções o alinhamento foi realizado e os resultados corroboram

com os resultados dos alinhamentos dos fragmentos gênicos. Desta forma, o gene *dk2* que sintetiza a proteína DK2, os genes *Xa1* e *Xa2* que sintetizam as proteínas XA1 e XA2 respectivamente, a PseC e a PSM seguiram os mesmos padrões das sequências de nucleotídeos dos seus respectivos genes, citados anteriormente na análise dos alinhamentos. Informações adicionais sobre as proteínas podem ser visualizadas na tabela 2.

DISCUSSÃO

É importante considerar que a LC é uma doença de fácil disseminação no rebanho e por isso é responsável por perdas econômicas na ovinocultura e caprinocultura, além de ser uma potencial zoonose. Desta forma, desperta-se o interesse em pesquisar novas estratégias de controle para essa enfermidade. Sabe-se que as vacinas são ferramentas eficazes na prevenção e controle de uma doença, por isso apostar na identificação de novos antígenos de *C. pseudotuberculosis* é de grande valia [2].

As vacinas de DNA e as vacinas de subunidades recombinantes são consideradas mais seguras do que vacinas vivas atenuadas [24]. O seu desenvolvimento depende da identificação de antígenos reativos que vai igualmente estimular a resposta imune mais eficaz ao agente infeccioso. Alguns estudos com *C. pseudotuberculosis* tiveram como objetivo desenvolver bibliotecas genômicas em cromossomo artificial bacteriano (BAC) para sequenciar o genoma desta bactéria e identificar a função de alguns genes por análise computacional e indicar possíveis genes que sintetizam proteínas com função antigênicas [8,25].

A vantagem de se construir uma biblioteca é a de não requerer conhecimento prévio de antígenos alvos, o qual permite a identificação de novos antígenos. Além disso, com grande parte do genoma da bactéria utilizado na biblioteca, pode-se buscar a expressão de vários genes em um mesmo experimento [22]. Neste estudo a técnica de imunovaredeira de biblioteca de expressão gênica para descobrir genes que codificam proteínas antigênicas de *C. pseudotuberculosis* demonstrou-se eficiente (Figura 4).

O gene *dk2* que codifica a enzima dihidroxiacetona quinase 2 (DK2), reagiu no clone 1 (Tabela 1). Essa enzima tem a função de converter dihidroxiacetona (Dha) em dihidroxiacetona fosfato (DhaP), pois as quinases possuem a atividade de catalisar e transportar fosfato terminal do ATP para compostos com receptor fosfato [26,27]. A Dha quando convertida em DhaP tem funções metabólicas em animais, plantas e bactérias. Em bactérias ela é integrante da via glicolítica e é uma importante fonte de fosfato para geração de energia [26,28,29].

A DK2 pode também atuar na evasão da resposta imune em certas viroses. O vírus da dengue, assim como outros RNA vírus, pode se beneficiar com a atuação dessa enzima para o desenvolvimento da doença. A DK2 atua interrompendo o gene indutor do ácido retinóico I (RIG-I), que sintetiza uma proteína que é sensora de viroses e ajudam a modular a resposta imune. Com a interrupção desse sensor, certos interferons ficam reduzidos e compromete a resposta antiviral [30,31]. Em bactérias não há relatos sobre a atuação da DK2 na evasão da resposta imune do hospedeiro. De acordo com o presente estudo, essa enzima tem propriedade antigênica, o que pode ser o primeiro relato de uma nova função desta enzima em bactérias.

O clone 2 apresentou partes de dois genes que ao ser sequenciado e comparado com as sequências genômicas do *GenBank* foi identificado como genes

transportadores de ferro (Tabela 1), no entanto não identificamos neste experimento qual dos dois foi o reagente ou se os dois reagiram aos soro positivos para LC. Esses genes são o *Xa1* e o *Xa2*, que são integrantes de um *operon* onde os demais genes são *Xa3* e *Xa4*. Esse *operon* codifica proteínas de membrana, que são responsáveis pela captação e transporte de ferro para o metabolismo de *C. pseudotuberculosis*, assim como em outras bactérias como, por exemplo, *Salmonella enterica typhimurium* [4,32].

Um estudo relatou que uma amostra mutante de *C. pseudotuberculosis* do gene *Xa2*, foi inoculada em caprinos para teste de virulência. A mesma não causou lesões nos linfonodos, ou seja, foi sugerido que houve uma dificuldade no desenvolvimento desta bactéria dentro organismo animal, por causa da dificuldade de captar ferro para o seu metabolismo. Isso sugere que o gene *Xa2* está relacionado com a virulência de *C. pseudotuberculosis* [4]. Estudos sobre o genoma da bactéria revelaram a organização e a conservação do *operon Xa* entre diferentes amostras de *C. pseudotuberculosis*, onde por análise computacional foi possível confirmar a afinidade das proteínas codificadas em se ligar e transportar ferro [33,34].

Existem compostos do sistema imune em mamíferos que atuam contra as enterobactinas, nome dado aos sideróforos (transportadores de ferro) das bactérias. A lipocalina 2 se liga aos sideróforos e ativa o sistema imune inato contra a infecção bacteriana [35]. Foi descrito que *Vibrio cholera* consegue evadir do sistema imune pelo fato da siderocalina não se ligar à vibriobactina, o que não ativa o sistema imune inato do hospedeiro [36]. Neste presente estudo a proteína do gene *Xa2* mostrou-se antigênica após reagir com soro de animais positivos para LC. Desta forma, ela torna-se uma possível candidata para o desenvolvimento de testes de diagnósticos sorológicos, bem como para o desenvolvimento de vacinas contra a LC. Não podemos

descartar a possibilidade das outras proteínas do *operon* terem a característica antigênica já que estão dispostas na membrana de *C. pseudotuberculosis*.

O gene que codifica uma proteína hipotética da família NlpC/P60, identificado no clone 3 (Tabela 1), foi descrito previamente em outros trabalhos cujo o objetivo era mapear o genoma de diferentes amostras de *C. pseudotuberculosis* [33,37]. As proteínas da família NlpC/P60 são encontradas em procariotos, eucariotos e vírus [38]. Elas possuem atividade de protease, amidase ou de aciltransferase e estão envolvidas na hidrólise de peptídeos da parede celular e também na divisão celular [39–42]. Diferentes proteínas bacterianas desta família foram comparadas e foi relatado que há resíduos ou regiões que são conservadas, mas não é possível definir se essas regiões estão relacionadas com o poder de infectividade do patógeno [43].

Em *Mycobacterium avium paratuberculosis*, causador da doença de Johne em ruminantes, a PseC, codificada pelo gene *MAP1272c*, reagiu com soro bovino positivo para doença [44]. Considerando o resultado da proteína do gene *MAP1272c* de *M. avium paratuberculosis* e sabendo-se essa bactéria faz parte da subordem *Corynebacterineae*, pode-se dizer, hipoteticamente, que essas proteínas apresentam alta atividade antigênica em diferentes patógenos.

Em outro estudo, a análise do gene *Rv2190c* de *Mycobacterium tuberculosis*, também pertencente à subordem *Corynebacterinae*, revelou que a proteína codificada também reagiu a soro de coelho positivo para infecção desta bactéria. Neste mesmo estudo ficou comprovado que a proteína tem influência no crescimento e na formação da parede celular bacteriana [45].

Um estudo sobre a proteína G6R do vírus da vaccínia demonstrou que ela atua na relação vírus-hospedeiro, sendo importante para o estabelecimento da infectividade e o desenvolvimento do vírus no hospedeiro vertebrado [46]. Essa

proteína pode ter características antigênicas, assim como relatado em bactérias da subordem *Corynebacterinae*, o que favoreceria no diagnóstico da doença causada por esse ou outros poxvírus, pois esses vírus possuem os genes codificadores desse tipo de proteína bem conservados dentro do grupo [47,48].

O clone 4 que reagiu positivamente com os soros dos animais positivos, possui um gene que codifica a proteína PSM. A sequência desse gene foi descrita anteriormente em um estudo do genoma de *C. pseudotuberculosis* [49]. Proteínas desse tipo encontram-se ancoradas à parede celular de bactérias Gram-positivas, como a *C. pseudotuberculosis*, por uma sequência motivo de aminoácidos específicos desse grupo de bactérias. A sequência motivo LPxTG é composta pelos aminoácidos leucina, prolina, x=qualquer aminoácido, treonina e glicina. O motivo LPxTG é responsável por ligar o peptidoglicano, que forma a espessa parede celular das bactérias Gram-positivas [50].

A enzima cisteína protease-trasnpeptidase sortase A (SRTA) ou sortase A, cliva o motivo LPxTG entre os resíduos de treonina e glicina e no mesmo local ela liga covalentemente proteínas de membrana. Essas proteínas ligadas ao motivo LPxTG geralmente estão relacionadas com a virulência das bactérias por terem a característica de auxiliar na adesão e invasão das células hospedeiras [51]. Um estudo realizado com a bactéria *Streptococcus gordonii*, demonstrou que existem diferentes proteínas da família LPxTG, na mesma bactéria, que possuem a sequência desse motivo conservada. Essas proteínas em *S. gordonii* foram identificadas como adesinas [52]. Em *Listeria monocytogenes* mutante com o gene que codifica a enzima sortase A deletado, a virulência tornou-se reduzida quando comparada com cepas selvagens. O fator descoberto foi a impossibilidade dessa bactéria de adentrar a célula

do hospedeiro. Sem a sortase A, as proteínas de adesão não foram ligadas covalentemente ao LPxTG, originando esse resultado [53].

A proteína PfbA de *Streptococcus pneumoniae* foi identificada como uma proteína da família LPxTG que auxilia na adesão e invasão da bactéria em células pulmonares em humanos. Foi relatado que ao submeter a *S. pneumoniae* a um crescimento em sangue humano contendo anticorpos anti-PfbA, houve uma redução de 50% no crescimento quando comparado ao crescimento sem anticorpos. O que leva a crer que essa proteína desencadeia uma resposta imune contra a bactéria e que essa proteína pode ser candidata a vacina para combater a doença [54]. Neste estudo ficou evidenciado que em *C. pseudotuberculosis* a proteína da família LPxTG, identificada pela comparação das sequências genicas do *GenBank*, também possui características antigênicas assim como em *S. pneumoniae*. No entanto não há evidência da real função dessa proteína em *C. pseudotuberculosis*. Pode-se levantar a hipótese que ela, assim como em outras bactérias Gram-positivas, seja uma adesina e favoreça o desenvolvimento da linfadenite caseosa.

Os genes aqui relatados são codificadores de proteínas de membrana. Proteínas desse tipo podem ser antigênicas, podendo favorecer o desenvolvimento de testes sorológicos para diagnóstico, bem como o desenvolvimento de vacinas contra LC. Isso se reforça quando analisamos os alinhamentos de cada gene com as sequências de outras cepas de *C. pseudotuberculosis*, integrantes do *GenBank*, pois se esses genes e suas respectivas proteínas são conservados entre diferentes cepas da bactéria, teoricamente uma vacina ou um método diagnóstico desenvolvidos a partir desses, teriam uma boa eficiência contra LC causada por diferentes cepas de diferentes regiões. Somente o gene *psec*, que se apresentou bem conservada entre diferentes cepas de *C. ulcerans*, pode apresentar reação cruzada entre *C.*

pseudotuberculosis e *C. ulcerans*, caso essa proteína seja selecionada para compor teste diagnóstico contra LC.

Este é o primeiro relato do uso da técnica de imunovarredura de biblioteca de expressão gênica com *C. pseudotuberculosis*, a qual nos possibilitou a obtenção de genes reagentes à soros de ovinos portadores da LC. Os genes obtidos neste estudo serão avaliados, em uma nova etapa, como possíveis antígenos em formulações de testes imunológicos para LC, como o ELISA e, como imunógenos em formulações vacinais frente ao desafio com a *C. pseudotuberculosis* patogênica.

Referências

1. Songer JG, Beckenbach K, Marshall MM, Olson GB, Kelley L (1988) Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Am J Vet Res 49: 223–226.
2. Dorella FA, Pacheco LGC, Oliveira SC, Miyoshi A, Azevedo V (2006) *Corynebacterium pseudotuberculosis* : microbiology , biochemical properties , pathogenesis and molecular studies of virulence. Vet Res 37: 201–218.
3. Eckersall PD, Lawson FP, Bence L, Waterston MM, Lang TL, et al. (2007) Acute phase protein response in an experimental model of ovine caseous lymphadenitis. BMC Vet Res 3: 35.
4. Billington SJ, Esmay PA, Songer JG, Jost BH (2002) Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 208: 41–45.
5. Kimberling C V (1988) Caseous Lymphadenitis. Jensen and Swift's Diseases of Sheep. Philadelphia: Lea e Febiger. pp. 374–377.
6. Pekelder JJ (2000) Caseous lymphadenitis. In: Martin WB. A, editor. Diseases of Sheep. Iowa: Blackwell Publishing. pp. 270–274.
7. Sobrinho AGS (2001) Principais Enfermidades dos Ovinos. Criação de ovinos. Jaboticabal: Funep. pp. 220–221.

8. Dorella F a, Fachin MS, Billault A, Dias Neto E, Soravito C, et al. (2006) Construction and partial characterization of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterial artificial chromosome library through genomic survey sequencing. *Genet Mol Res* 5: 653–663.
9. Seyffert N, Guimarães AS, Pacheco LGC, Portela RW, Bastos BL, et al. (2010) High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. *Res Vet Sci* 88: 50–55. doi:10.1016/j.rvsc.2009.07.002.
10. Eggleton DG, Middleton HD, Doidge C V, Minty DW (1991) Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. *Aust Vet J* 68: 317–319.
11. Stanford K, Brogden KA, McClelland LA, Kozub GC, Audibert F (1998) The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. *Can J Vet Res* 62: 38–43.
12. Williamson LH (2001) Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 17: 359–371, vii.
13. Paton MW, Walker SB, Rose IR, Watt GF (2003) Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Aust Vet J* 81: 91–95.
14. Ribeiro OC, Silva JAH, Oliveira SC, Meyer R, Fernandes GB (1991) Dados preliminares sobre uma vacina viva contra a linfadenite caseosa.pdf. *Pesqui Agropecuária Bras* 26: 461–465.
15. Marcel J, Pinho R, Dorella FA, Coelho S, Fonseca CT, et al. (2009) Heat-Shock Protein (Hsp) -60 is Able to Induce an Immune Response in Mice , But Fails to Confer Protection Against Infection: 22–27.
16. Costa MP, McCulloch JA, Almeida SS, Dorella FA, Fonseca CT, et al. (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 Res Notes* 4: 243.
17. Ribeiro D, Rocha F De, Leite KM, Soares S De, Silva A, et al. (2014) An iron-acquisition-deficient mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis* efficiently protects mice against challenge. *Vet Res* 45: 28.
18. Dorella FA, Pacheco LG, Seyffert N, Portela RW, Meyer R, et al. (2009) Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 8: 205–213.
19. Helfman DM, Feramisco JR, Fiddes JC, Thomas GP, Hughes SH (1983) Identification of clones that encode chicken tropomyosin by direct

- immunological screening of a cDNA expression library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 31–35.
20. Swoboda I, Bugajska-Schretter A, Verdino P, Keller W, Sperr WR, et al. (2002) Recombinant carp parvalbumin, the major cross-reactive fish allergen: a tool for diagnosis and therapy of fish allergy. *J Immunol* 168: 4576–4584.
 21. Hoppe S, Bier FF, Nickisch-Rosenegk M V (2013) Rapid identification of novel immunodominant proteins and characterization of a specific linear epitope of *Campylobacter jejuni*. *PLoS One* 8: e65837.
 22. Miller L, Richter M, Hapke C, Stern D, Nitsche A (2011) Genomic expression libraries for the identification of cross-reactive orthopoxvirus antigens. *PLoS One* 6: e21950.
 23. Zhang Y, Praszkie J, Hodgson A, Pittard AJ (1994) Molecular analysis and characterization of a broad-host-range plasmid, pEP2. *J Bacteriol* 176: 5718–5728.
 24. Kennedy RB, Ovsyannikova I, Poland GA (2009) Smallpox vaccines for biodefense. *Vaccine* 27.
 25. D'Afonseca V, Prosdocimi F, Dorella F a, Pacheco LGC, Moraes PM, et al. (2010) Survey of genome organization and gene content of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Microbiol Res* 165: 312–320.
 26. Siebold C, García-Alles LF, Erni B, Baumann U (2003) A mechanism of covalent substrate binding in the x-ray structure of subunit K of the *Escherichia coli* dihydroxyacetone kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8188–8192.
 27. Cheek S, Ginalski K, Zhang H, Grishin N V (2005) A comprehensive update of the sequence and structure classification of kinases. *BMC Struct Biol* 5: 6.
 28. Jenkins BT, Hajra a K (1976) Glycerol kinase and dihydroxyacetone kinase in rat brain. *J Neurochem* 26: 377–385.
 29. Bächler C, Schneider P, Bähler P, Lustig A, Erni B (2005) *Escherichia coli* dihydroxyacetone kinase controls gene expression by binding to transcription factor DhaR. *EMBO J* 24: 283–293.
 30. Komuro A, Bamming D, Horvath CM (2009) Negative Regulation of Cytoplasmic RNA-Mediated Antiviral Signaling. *Cytokine* 43: 350–358.
 31. Ubol S, Phuklia W, Kalayanarooj S, Modhiran N (2010) Mechanisms of immune evasion induced by a complex of dengue virus and preexisting enhancing antibodies. *J Infect Dis* 201: 923–935.
 32. Nagy T a, Moreland SM, Andrews-Polymenis H, Detweiler CS (2013) The Ferric Enterobactin Transporter, Fep, is Required for Persistent *Salmonella* Infection. *Infect Immun* 81: 4063–4070.

33. Ruiz JC, D'Afonseca V, Silva A, Ali A, Pinto AC, et al. (2011) Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. PLoS One 6: e18551.
34. Aquino de Sá MDC, Gouveia GV, Krewer CDC, Veschi JLA, de Mattos-Guaraldi AL, et al. (2013) Distribution of PLD and fagA, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseus lymphadenitis. Genet Mol Biol 36: 265–268.
35. Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, et al. (2004) Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. Nature 432: 917–921.
36. Li N, Zhang C, Li B, Liu X, Huang Y, et al. (2012) Unique iron coordination in iron-chelating molecule vibriobactin helps *Vibrio cholerae* evade mammalian siderocalin-mediated immune response. J Biol Chem 287: 8912–8919.
37. Silva A, Schneider MPC, Cerdeira L, Barbosa MS, Ramos RTJ, et al. (2011) Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* I19, a strain isolated from a cow in Israel with bovine mastitis. J Bacteriol 193: 323–324.
38. Rando RR (2002) Membrane-bound lecithin-retinol acyltransferase. Biochem Biophys Res Commun 292: 1243–1250.
39. Ishikawa S, Hara Y, Ohnishi R, Sekiguchi J (1998) Regulation of a new cell wall hydrolase gene, cwIF, which affects cell separation in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 180: 2549–2555.
40. Margot P, Wahlen M, Gholamhoseinian a, Piggot P, Karamata D, et al. (1998) The *lytE* gene of *Bacillus subtilis* 168 encodes a cell wall hydrolase. J Bacteriol 180: 749–752.
41. Ohnishi R, Ishikawa S, Sekiguchi J (1999) Peptidoglycan hydrolase LytF plays a role in cell separation with CwIF during vegetative growth of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 181: 3178–3184.
42. Xu Q, Rawlings ND, Chiu H-J, Jaroszewski L, Klock HE, et al. (2011) Structural analysis of papain-like NlpC/P60 superfamily enzymes with a circularly permuted topology reveals potential lipid binding sites. PLoS One 6: e22013.
43. Anantharaman V, Aravind L (2003) Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes. Genome Biol 4: R11.
44. Bannantine JP, Lingle CK, Stabel JR, Ramyar KX, Garcia BL, et al. (2012) MAP1272c encodes an NlpC/P60 protein, an antigen detected in cattle with Johne's disease. Clin Vaccine Immunol 19: 1083–1092.

45. Parthasarathy G, Lun S, Guo H, Ammerman NC, Geiman DE, et al. (2012) Rv2190c, an NlpC/P60 family protein, is required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One 7: e43429.
46. Senkevich TG, Wyatt LS, Weisberg AS, Koonin E V., Moss B (2009) A conserved poxvirus NlpC/P60 superfamily protein contributes to vaccinia virus virulence in mice but not to replication in cell culture. Virology 374: 506–514.
47. Upton C, Slack S, Hunter AL, Roper RL, Ehlers A (2003) Poxvirus Orthologous Clusters : toward Defining the Minimum Essential Poxvirus Genome Poxvirus Orthologous Clusters : toward Defining the Minimum Essential Poxvirus Genome. J Virol.
48. Iyer LM, Balaji S, Koonin E V, Aravind L (2006) Evolutionary genomics of nucleo-cytoplasmic large DNA viruses. Virus Res 117: 156–184.
49. Trost E, Al-Dilaimi A, Papavasiliou P, Schneider J, Viehoveer P, et al. (2011) Comparative analysis of two complete *Corynebacterium ulcerans* genomes and detection of candidate virulence factors. BMC Genomics 12: 383.
50. Chhatwal GS (2002) Anchorless adhesins and invasins of Gram-positive bacteria: a new class of virulence factors. Trends Microbiol 10: 205–208.
51. Paterson GK, Mitchell TJ (2004) The biology of Gram-positive sortase enzymes. Trends Microbiol 12: 89–95.
52. Davies JR, Svensäter G, Herzberg MC (2009) Identification of novel LPXTG-linked surface proteins from *Streptococcus gordonii*. Microbiology 155: 1977–1988.
53. Sabet C, Lecuit M, Cabanes D, Cossart P (2005) LPXTG Protein InlJ , a Newly Identified Internalin Involved in *Listeria monocytogenes* Virulence LPXTG Protein InlJ , a Newly Identified Internalin Involved in *Listeria monocytogenes* Virulence. Infect Immun.
54. Yamaguchi M, Terao Y, Mori Y, Hamada S, Kawabata S (2008) PfbA, a novel plasmin- and fibronectin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*, contributes to fibronectin-dependent adhesion and antiphagocytosis. J Biol Chem 283: 36272–36279.

ANEXO 1. Tabelas

Tabela 1. Análise da comparação pelo algoritmo *Blast* dos genes sequenciados dos clones positivos de *C. pseudotuberculosis* com os genes do *GenBank*.

Clones	Genes	<i>E-value</i> *	Identidade (%)	Acesso <i>GenBank</i>	Tamanho	
					Fragmento sequenciado (pb)	Gene total (pb)
1	<i>dk2</i>	0	100	CP001829	720	1716
2	<i>Xa1</i>	3e-84	100	AF401634	174	1068
	<i>Xa2</i>	0	100	AF401634	640	987
3	<i>psec</i>	5e-76	100	CP001829	158	867
4	<i>psm</i>	0	100	CP001829	972	1677

* Quanto mais próximo de zero o *E-value*, menor é a probabilidade do alinhamento das sequências de genes acontecerem ao acaso.

Tabela 2. Análise da comparação, pelo algoritmo *Blast*, das proteínas sintetizadas a partir dos genes sequenciados dos clones positivos de *C. pseudotuberculosis*, com as proteínas do *GenBank*.

Clones	Proteínas	Tamanho da proteína		Peso Molecular	
		Fragmento traduzido (aa*)	Proteína total (aa)	Fragmento traduzido (kDa)	Proteína total (kDa)
1	DK2	239	571	26,29	62,81
2	XA1	58	356	6,38	39,16
	XA2	214	329	23,54	36,19
3	PseC	53	289	5,83	31,79
4	PSM	324	559	35,64	61,49

* Aminoácidos.

ARTIGO 2
Normas da revista Vaccine

Imunoproteção gerada por vacinas de DNA e de subunidade a partir do gene *Xa1* de *Corynebacterium pseudotuberculosis* contra linfadenite caseosa em camundongos

Cleber Eduardo Galvão^a, Lenita Ramires dos Santos^b, Odinéia Forner^c, Cleber Oliveira Soares^b, Grácia Maria Soares Rosinha^{b*}

^a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Avenida Senator Filinto Müller, nº 2443 – Caixa postal 549, Vila Ipiranga, Campo Grande - MS, Brasil

^b Embrapa Gado de Corte – Sanidade Animal – Laboratório de Engenharia Genética Animal, Avenida Radio Maia , nº 830, Vila Popular, Campo Grande - MS, Brasil.

^c Universidade Federal do Paraná (UFPR), Rua XV de Novembro, nº 1299, Centro, Curitiba - PR, Brasil

* Autor correspondente: gracia.rosinha@embrapa.br

RESUMO

Linfadenite caseosa (LC), é causada pela bactéria Gram-positiva *Corynebacterium pseudotuberculosis*. É uma das doenças de grande importância econômica na ovinocultura e caprinocultura. Vacinas comerciais disponíveis não oferecem proteção adequada aos animais. Portanto, o desenvolvimento de vacinas mais eficientes contra LC é necessário. Neste estudo avaliou-se o gene *Xa1* de *C. pseudotuberculosis* como imunógeno na forma de vacina de DNA, bem como na forma de subunidade recombinante. Camundongos foram imunizados com pcDNAXa1, pcDNAXa1+XA1r-Montanide e XA1r-Montanide e desafiados com uma cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*. O estado clínico e as alterações anatomopatológicas foram

avaliadas após o desafio. A detecção de IgG específico no soro dos camundongos imunizados, bem como seus isotipos IgG1 e IgG2a, foram avaliadas por ELISA indireto. Os níveis de IFN- γ e IL-10 foram determinados por ELISA de captura a partir dos sobrenadantes de culturas de esplenócitos, estimulados com XA1r. As respostas imunes celular e humoral induzidas pelas formulações vacinais pcDNAXa1, pcDNAXa1+XA1r-Montanide e XA1r-Montanide, foram capazes de proteger camundongos após o desafio com *C. pseudotuberculosis* virulenta, resultando na sobrevivência de camundongos sem alterações clínicas e anatomopatológicas características de LC. Essas formulações podem ser promissoras contra a LC em ovinos e caprinos.

Palavras-chave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Linfadenite caseosa; Vacina de DNA; Vacina de subunidade; Resposta imune.

1. Introdução

Corynebacterium pseudotuberculosis é um bacilo Gram-positivo e intracelular facultativo causador da linfadenite caseosa (LC), doença que afeta ovinos e caprinos [1]. Em geral as infecções são retidas aos gânglios linfáticos, porém, através da disseminação da exotoxina fosfolipase D pode se tornar sistêmica, levando a contaminação de todo o sistema linfático [2]. É de prevalência elevada em muitas partes do mundo e causa significantes perdas econômicas, principalmente por causa de desclassificação de pele e condenação das carcaças que se encontram infectadas ao abate [3].

A LC é uma doença de difícil erradicação, devido a ineficácia da terapia com drogas e a falha em seu diagnóstico clínico precoce [4]. Como método preventivo, encontram-se disponíveis vacinas que são produzidas a partir da fosfolipase D (PLD), que mostrou-se eficaz, pelo menos parcialmente, contra *C. pseudotuberculosis* [5]. Outra opção disponível é uma vacina viva atenuada de *C. pseudotuberculosis* 1002, que foi testada a campo e apresentou uma eficiência de 83% [6]. Essa vacina viva atenuada oferece limitações com relação às condições do seu armazenamento, pois necessita de refrigeração, e também com relação ao risco de infecção à pessoa que a manipula durante a vacinação do rebanho. Vacina de DNA não necessita de refrigeração e não oferece risco de infecção ao manipulador, o que favorece uma vacinação mais segura à campo. As vacinas de subunidade necessitam de refrigeração, mas elas também não oferecem risco de infecção ao manipulador.

Em um estudo desenvolvido por nosso grupo para descobrir proteínas antigênicas e imunogênicas a partir de imunovarredura de biblioteca de expressão gênica de *C. pseudotuberculosis* (dados submetidos à publicação), detectou-se que os genes *Xa1* e *Xa2* tem um potencial antigênico quando reagiram com soro de ovinos positivos pra LC. Esses genes compõem o *operon Xa*, acompanhados dos genes *Xa3* e *Xa4*. Eles são responsáveis pela aquisição de ferro para o metabolismo da *C. pseudotuberculosis*, desta forma estão relacionados com a virulência dessa bactéria. Os genes do *operon fag* sintetizam proteínas de membrana e isso pode contribuir para que essas sejam reconhecidas pelo sistema imune como proteínas antigênicas e imunogênicas [2].

A partir da descoberta do gene *Xa1* pela imunovarredura, este foi testado em camundongos, quanto a capacidade de proteção e níveis de resposta imune humoral e celular em duas formulações vacinais; vacina de DNA e vacina de subunidade.

2. Materiais e métodos

2.1. Cepas bacterianas, procedimentos de estocagem e cultura

Corynebacterium pseudotuberculosis biovar *ovis* (cepa CP 28033), foi utilizada para extração de DNA genômico, inoculação para determinação de desafio e desafio pós imunização em camundongos. *C. pseudotuberculosis* cepa 1002 (Linfovac - Vencofarma®), foi utilizada como controle positivo na vacinação dos camundongos. *Escherichia coli* Top 10 F' ou *E. coli* DH5α (Invitrogen®), foram utilizadas para clonagem, armazenamento e expansão plasmidial. *E. coli* Rosetta-gami (Novagen®) foi utilizada para expressão do gene *Xa1* para obtenção da proteína recombinante XA1.

As cepas de *C. pseudotuberculosis* foram aerobicamente crescidas em meio Brain Heart Infusion (BHI) (BD Biosciences®) líquido por 48 horas a 37 °C, aliquotadas em glicerol 20% e estocadas a -80 °C. Quando necessário, uma alíquota era utilizada para estriamento e crescimento de colônias por 48 horas a 37 °C em placas de petri contendo meio BHI ágar com adição de 5% de sangue ovino. As cepas de *E. coli* Top 10 F' e DH5α foram crescidas, com aeração, em meio Luria-Bertani (LB) (BD Biosciences®) líquido por 16 horas a 37 °C, seguindo o mesmo protocolo de aliquotagem e estocagem das cepas de *C. pseudotuberculosis*. Para obtenção de colônias as amostras eram estriadas em placas de petri contendo LB ágar e incubadas a 37 °C por 16 horas. A cepa de *E. coli* Rosetta-gami foi crescida em meio 3YT líquido (Tryptona 12 g; Extrato de levedura 7,5 g; NaCl 2,5 g; H₂O q.s.p 500 mL), seguindo as mesmas condições de crescimento e estocagem das outras cepas de *E. coli*. Para obtenção de colônias utilizou-se placas de petri contendo meio 3YT ágar e crescidas conforme já descrito anteriormente.

2.2. Camundongos e ética na experimentação animal

Camundongos BALB/c fêmeas, com faixa etária entre seis a oito semanas de idade, foram obtidas por compra do biotério da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O modelo murino foi escolhido por ser suscetível à *C. pseudotuberculosis* e desenvolver a formação de abscessos, tal qual a LC quando ocorre em ovinos e caprinos. O projeto para o desenvolvimento deste estudo foi submetido, avaliado e provado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), sendo certificado com o registro nº 377/2011.

2.3. Produção da vacina de DNA

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de cultura da cepa *C. pseudotuberculosis* 28033, segundo a metodologia descrita por Zhang et al. [7]. A qualidade e concentração do DNA extraído foram avaliados em espectrofotômetro Nanodrop® e por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com Sybr Gold (Invitrogen®) e visualizado em transiluminador ultravioleta.

O gene *Xa1* foi amplificado reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: *Xa1F* 5' – CCC CGG ATC CAT GGT TTC GAC CGC CTC ATC CAA CCC TAGC – 3' para orientação senso, com sítio de restrição para enzima *Bam*HI e a sequência consenso de Kozak; *Xa1R* 5' – CCC GTC TAG ATC ACA TGT CTC CCT TCC TAG ATT GTG CAT AAG CGA TG – 3' para orientação antisenso, com sítio de restrição para a enzima *Xba*I. Os oligonucleotídeos foram desenhados a partir do programa DNASTAR®, baseado na sequência genômica

da cepa de *C. pseudotuberculosis* FRC41 (acesso no *GenBank* CP002097.1). Foi utilizado 100 ng de DNA em uma reação de 50 µL contendo tampão 10X, 1,5mM de MgCl₂, 0,5mM de dNTPs, 5 pmol de cada oligonucleotídeo e 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®). A amplificação foi realizada a partir de 94 °C durante 2 minutos para desnaturação inicial e 34 ciclos consistindo em 94 °C durante 30 segundos para desnaturação, 56 °C por 45 segundos para anelamento dos oligonucleotídeos, 72 °C durante 1 minuto para extensão, além de 72 °C durante 10 minutos para extensão final.

O produto da PCR, purificado com *QIAEX II Gel Extraction Kit* (Qiagen®) e o vetor pcDNATM3.1(+) (Invitrogen®) foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xba*I (New England BioLabs®). Os produtos digeridos foram então purificados com *QIAEX II Gel Extraction Kit* e ligados com T4 DNA Ligase (Promega®). Ocorreu a formação do plasmídeo pcDNAXa1. O mesmo foi introduzido em células competentes *E. coli* DH5α, e uma colônia recombinante foi selecionada. O DNA plasmidial foi extraído por meio do o kit *Wizard miniprepTM* (Promega®). A presença do inserto no plasmídeo foi confirmada por sequenciamento automático, utilizando o kit *Big Dye Terminator v 3.1 Cycle* (Invitrogen®) e também por digestão enzimática com *Bam*HI e *Xba*I (New England BioLabs®), esta analisada por meio eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com *Sybr Gold* (Invitrogen®) e visualizado em transiluminador ultravioleta com fotodocumentação. O plasmídeo vazio pcDNATM3.1(+), utilizado como controle, e o plasmídeo pcDNAXa1 foram introduzidos em *E. coli* DH5α competente, e colônias individuais foram selecionadas e crescidas em meio LB líquido, conforme descrito anteriormente, para produção em larga escala dos plasmídeos. Tais plasmídeos foram purificados usando o kit *EndoFree Giga* (Qiagen®). A qualidade e concentração do DNA plasmidial extraído foram avaliados

em espectrofotômetro Nanodrop® e por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com *Sybr Gold* (Invitrogen®) e visualizado em transiluminador ultravioleta. Os plasmídeos foram diluídos em solução fosfato salina (PBS) estéril para a concentração final de 1 µg/µL.

2.4. Avaliação da transcrição do RNA mensageiro pelo plasmídeo pCDNAXa1 em células eucarióticas *in vivo*

Para a avaliação da expressão do gene *Xa1* em células de eucarioto *in vivo*, foram utilizados cinco camundongos BALB/c, sendo que, quatro receberam uma única dose de 100 µg, pela via intramuscular no tríceps sural, do plasmídeo vacinal pCDNAXa1 e um animal recebeu 100 µL de PBS como controle negativo, pela mesma via. Os camundongos foram eutanasiados, por deslocamento cervical, 24, 48 e 72 horas e 7 dias após receberem a dose única de pCDNAXa1. O camundongo injetado com PBS foi eutanasiado após 7 dias da inoculação. Uma porção do tríceps sural foi coletada para a extração de RNA total, em condições assépticas, e armazenada a -80°C para posterior análise.

Os músculos foram tratados com o reagente Trizol (Invitrogen®) e o RNA total foi extraído. Subsequentemente, o RNA foi extraído com clorofórmio e precipitado com álcool isopropílico. O RNA total extraído foi dissolvido em água livre de nuclease (Invitrogen®) e quantificado em espectrofotômetro Nanodrop®. Antes de realizar o procedimento de transcrição reversa, o RNA total (1-10 µg) foi tratado com a enzima *Amplification grade DNase I* (Invitrogen®), e após a constatação da qualidade e pureza do RNA extraído, a transcrição reversa do RNA para cDNA foi realizada com até 10

µg de RNA total utilizando a enzima transcriptase reversa do sistema ImProm-II™ *Reverse Transcription System* (Promega®). A PCR, a partir do cDNA obtido, foi realizada conforme já descrito anteriormente.

2.5. Produção da proteína XA1r

A sequência do gene *Xa1* que codifica a porção hidrofílica da proteína XA1, foi selecionada com o auxílio do programa Protean (DNASTAR®). Esta sequência e a construção do plasmídeo de expressão gênica foram sinteticamente confeccionados pela empresa de biotecnologia Genone *Biotechnologies*. Nas extremidades do fragmento do gene *Xa1* foram inseridos o sítio de restrição para a enzima *EcoRI*. Esta sequência foi ligada ao plasmídeo de expressão gênica em procariotos pET-47b(+) (Novagen®). O sequenciamento para confirmação da construção plasmidial foi realizado e fornecido pela empresa. O plasmídeo recombinante pET47b*Xa1* foi inserido *E. coli* da TOP10 F' quimicamente competente, para obtenção de estoque e cultivo. Foi realizada a cultura da cepa estoque, em meio LB líquido, para extração e purificação do plasmídeo pET47b*Xa1* com o kit *Wizard miniprep*™ (Promega®).

O plasmídeo pET47b*Xa1* foi introduzido em célula quimicamente competente *E. coli* Rosetta-gami. A indução da expressão gênica foi realizada em meio 3YT líquido (Tryptona 12 g; Extrato de levedura 7,5 g; NaCl 2.5 g; H₂O q.s.p 500 mL) com Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) à 1 mM, por incubação a 28 °C, por 4 horas em agitação a 200 rpm. A XA1r foi purificada por cromatografia de afinidade em resina metálica com a coluna de agarose níquel *His trap HP* (GE Healthcare®) de acordo com as instruções do fabricante. Após, foi realizada a diálise em PBS por 72 horas, a 4 °C

e avaliação da purificação em gel SDS-PAGE 15%. A proteína purificada foi quantificada pelo método descrito por Lowry [8] e estocada a -20° C para uso como vacina de subunidade e uso como antígeno nos testes de ELISA. A indução e a purificação da XA1r foi verificada por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) 15%, corado com azul brilhante de Comassie e *Western blot* com *poly-Histidine monoclonal antibody* (Sigma-Aldrich®).

2.6. Determinação da dose de desafio

Camundongos BALB/c foram divididos em quatro grupos com quatro integrantes cada. Os grupos foram nomeados de acordo com a dose recebida de *C. pseudotuberculosis* CP 28033. As doses foram administradas por via intraperitoneal. O primeiro grupo recebeu a dose de 1×10^4 unidade formadora de colônias (UFC), o segundo grupo recebeu 1×10^5 UFC. O terceiro grupo recebeu 1×10^6 UFC. O quarto grupo recebeu 100 µl de PBS, para controle. A quantificação e determinação das UFC's foi determinada pela técnica de *Spread Plate* desenvolvido por Robert Koch em 1883 [9]. A dose de desafio foi determinada a partir do grupo que obteve: alterações relevantes no estado clínico, tais como inapetência, a consumpção, a desidratação, a pelagem eriçada e a apatia; Alterações anatomopatológicas consideráveis, como a formação de abscessos e alterações macroscópicas em órgãos como baço, rins e fígado, que levaram ao óbito ou não, em um período de observação total de 30 dias.

2.7. Imunização e desafio

Camundongos BALB/c foram divididos em oito grupos de dez integrantes cada. Os grupos foram denominados da seguinte forma: pcDNAXa1, XA1r-Montanide, pcDNAXa1+XA1r-Montanide (*booster*), pcDNATM3.1(+), Montanide, 1002 (cepa viva vacinal comercial), Bacterina e PBS. Como adjuvante da proteína XA1r foi utilizado o montanide e o preparo da reação foi de acordo com Miles et al. [10]. A bacterina foi obtida pelo aquecimento a 100 °C por 1 hora, de *C. pseudotuberculosis* CP 28033 para sua inativação. Após esse procedimento, a inativação foi confirmada por cultura em meio BHI ágar-sangue, como já descrito anteriormente, para avaliar se houve crescimento de colônias. Na tabela 1 está descrito o esquema de imunização que foi realizado com os camundongos. A quantidade de 25 µg da XA1r para injeção foi determinada pelo fato dessa porção da XA1 conter a maior parte de região hidrofílica, o que pode facilitar sua captura pelas células do sistema imune.

Tabela 1

Programa de imunização dos camundongos

Grupos	Esquema de Imunização (Dias)		
	0	15º	30º
pcDNAXa1	100 µg (IM)	100 µg (IM)	100 µg (IM)
XA1r-Montanide	25 µg (SC)	25 µg (SC)	25 µg (SC)
pcDNAXa1+XA1r-Montanide	100 µg (IM)	100 µg (IM)	25 µg* (SC)
pcDNA TM 3.1(+)	100 µg (IM)	100 µg (IM)	100 µg (IM)
Montanide	100 µL (SC)	100 µL (SC)	100 µL (SC)
1002	50 µL (IP)	-	-
Bacterina	1x10 ⁵ (IP)	1x10 ⁵ (IP)	1x10 ⁵ (IP)
PBS	100 µL (IM)	100 µL (IM)	100 µL (IM)

(IM): Intramuscular. (SC): Subcutânea. (IP): Intraperitoneal.

* Última dose do grupo pcDNAXa1+XA1r-Montanide foi com a proteína recombinante.

Cinco animais de cada grupo foram desafiados intraperitonealmente 21 dias após a última imunização com a cepa virulenta *C. pseudotuberculosis* CP 28033. Os animais do grupo 1002 foram desafiados 49 dias depois de serem vacinados com uma única dose. Neste mesmo período os outros cinco animais de cada grupo foram encaminhados para esplenectomia para obtenção de esplenócitos e avaliação da resposta imune celular.

2.8. Análise da resposta imune humoral

Amostras de sangue, dos dez animais de cada grupo, foram coletadas por punção do plexo retro-orbital um dia antes de cada imunização e um dia antes do desafio. Os olhos dos animais foram anestesiados antes das coletas com 1 gota de solução oftálmica de Cloridrato de Proximetacaina 0,5%, deixando agir por 30 segundos. Os soros obtidos foram congelados a -20 °C, e descongelados quando necessário.

A resposta imune humoral foi avaliada pelos níveis de IgG e de suas subclasses IgG1 e IgG2 por meio de ELISA indireto. Como antígeno foi utilizada a proteína XA1r, adsorvida em placas de poliestireno de 96 poços (Costar® 3590). Para a adsorção, foi aplicado por poço 0,5 µg da proteína em tampão carbonato bicarbonato 0,05 M pH 9,6 (0,5 µg/100 µl/poço). As placas foram então incubadas em câmara úmida a 4 °C por 16 horas.

Para detecção de IgG, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS/0,05% (v/v) Tween 20 (PBS-T) e incubadas a 37 °C por 1 hora com 200 µL/poço de solução de bloqueio (PBS-T e 5% de leite bovino em pó). Neste intervalo, os soros foram

diluídos na proporção 1:100 em solução de diluição (PBS-T e 1% de leite bovino em pó). Como soro controle positivo foi feito um *pool* dos soros dos animais do grupo XA1r-Montanide, que já haviam recebido as 3 doses da proteína recombinante. O soro controle negativo foi feito com um *pool* dos soros dos animais do grupo PBS, que também já haviam recebido as 3 doses de PBS. Terminada a incubação, as placas foram novamente lavadas, e foram adicionados, em duplicata, 100 µL/poço de cada soro diluído, seguindo a mesma incubação citada anteriormente. Após, as placas foram novamente lavadas e foram adicionados 100 µL/poço do *anti-mouse* IgG ligado a peroxidase (Sigma-Aldrich®) diluído, com solução de diluição, na proporção 1:10,000. As placas foram novamente incubadas conforme descrito anteriormente. Após incubação e nova lavagem, foram adicionados 95 µL/poço de o-fenilenediamina (OPD) (Sigma-Aldrich®) (diluído conforme instruções do fabricante). As placas foram então incubadas por 20 minutos protegidas da luz, para ocorrer a reação colorimétrica. A reação foi parada com adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico a 3 M. A densidade óptica (DO) foi lida com absorbância de 490 nm em espectrofotômetro.

Para detecção de IgG1 e IgG2a, seguiu-se o mesmo procedimento inicial de adsorção da XA1r nas placas. Essas placas foram submetidas a duas lavagens com PBS-T, sendo bloqueadas com 200 µL/poço de PBS/10% (v/v) de soro fetal bovino (PBS-SFB). As placas foram incubadas em câmara úmida a temperatura por 2 horas. Os soros foram diluídos com PBS-SFB na proporção de 1:500, sendo utilizados os mesmo controles negativos e positivos descritos anteriormente. Uma nova lavagem foi realizada, duas vezes, com PBS-T após o término da incubação. O mesmo procedimento da aplicação dos soros do ELISA para IgG foi empregado. As placas foram incubadas por 1 hora em câmara úmida a temperatura ambiente. Seguiu-se de quatro lavagens com PBS-T e os *anti-mouse* IgG1 e IgG2a (BD Biosciences®), ambos

diluídos com PBS-SFB na proporção 1:500, foram aplicados a 100 µL/poço, respectivamente. Uma nova incubação por 2 horas foi realizada, nas mesmas condições descritas. Seis lavagens com PBS-T foram realizadas antes de aplicar 100 µL/poço de Avidina Peroxidase (Sigma-Aldrich®) (diluída com PBS-SFB na proporção de 1:2,000). As placas foram então incubadas por 45 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente. Encerrado este tempo, as placas foram lavadas oito vezes com PBS-T. O mesmo procedimento empregado em no ELISA de IgG com o uso do OPD e leitura no espectrofotômetro foi realizado.

Foi necessário realizar a titulação dos soros de alguns grupos, que obtiveram altos níveis de ambos os isotipos, para verificar diferença significativa entre IgG1 e IgG2a. Para isso empregou-se o mesmo procedimento do ELISA indireto para IgG1 e IgG2a, diferenciando-se apenas nas diluições do soros. Os soros positivos e negativos foram diluídos com fator de diluição 2 de 1:500 até 1:2,000. Os soros testes foram diluídos com fator 3 de diluição de 1:100 até 1:218,700.

2.9. Avaliação da resposta imune celular

Cinco animais de cada grupo, que não foram desafiados, foram eutanasiados por deslocamento cervical, 21 dias após a última imunização, e esplenectomizados para obtenção dos esplenócitos a serem cultivados para avaliação da resposta imune celular. Os baços foram macerados em 2 ml de meio RPMI 1640 (Gibco®). Em placas de 24 poços foram aplicadas 2×10^6 esplenócitos/poço, diluídos em meio RPMI suplementado (10% (v/v) de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina G sódica, 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina, e 50 mM 2-ME (Sigma Immunochemicals®). Os

esplenócitos de cada animal foram estimulados com 5 µg/mL de XA1r e 5 µg/ml de Conavalina A (ConA). Um controle negativo, composto pelo meio suplementado apenas, para os esplenócitos de cada animal também foi utilizado, onde não foi adicionado nenhum agente estimulante. As placas foram então incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ em atmosfera úmida, por 48 horas, em meio RPMI suplementado. Após esse período o sobrenadante das culturas dos esplenócitos foram coletados e armazenados a -20 °C até o uso.

Os sobrenadantes foram utilizados para determinar a concentração de interferon-gama (IFN-γ) e interleucina 10 (IL-10) nas culturas de esplenócitos de cada animal. Para isso foi realizado o ELISA de captura o kit comercial BD OptEIA™ (BD Biosciences®), diferenciando apenas no uso do cromógeno que foi o SIGMAFAST™ OPD (Sigma-Aldrich®). A DO foi lida com absorbância de 490 nm em espectrofotômetro.

2.10. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio dos testes Anova, Tukey (com $P < 0,05$ quando houve diferença significativa) e Šídák (com $P < 0,0001$ quando houve diferença significativa) para avaliação da diferença entre os grupos, dos resultados dos ELISAS indiretos e dos ELISAS de captura. Para isso foi utilizado o programa *GraphPad Prism*, versão 6 para o Windows (GraphPad®). O mesmo programa foi utilizado para confecção dos gráficos.

2.11. Avaliações das alterações clínicas e anatomopatológicas dos camundongos imunizados e desafiados

Após o desafio, com injeção intraperitoneal, com a cepa virulenta CP 28033 de *C. pseudotuberculosis*, todos os animais foram observados durante o período de 30 dias. Neste período foi avaliado o estado clínico de cada animal dos grupos, levando em consideração a inapetência, a consumpção, a desidratação, a pelagem eriçada e a apatia. As avaliações foram realizadas diariamente. Os óbitos foram contabilizados e os animais que estavam em um estado de sofrimento avançado foram eutanasiados e também contabilizados como óbito. Após, os corpos dos animais foram encaminhados para necropsia para avaliação de alterações anatomopatológicas. Todas as alterações encontradas durante as necropsias foram foto-documentadas.

Durante a necropsia, rins, fígados e baços de alguns animais de cada grupo, com e sem alterações, foram coletados e fixados em formol 10% por 48 horas. Os fragmentos foram rotineiramente processados para lâminas histológicas, coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) para a descrição histopatológica [11]. A coloração de Gram Histológico (método de Macallum Goodpasture) foi realizada para a observação de colônias bacterianas [12]. As lâminas foram observadas com o auxílio de um microscópio óptico de luz e as imagens foram obtidas por um sistema de captura de imagens adequado. Não foram analisados histologicamente todos os animais dos grupos, portanto foram selecionadas amostras de baço, rins e fígado de alguns animais com e sem LC. Dessa forma, os cortes histológicos corados em HE foram analisados para a presença ou não de alterações microscópicas, principalmente a

formação de abscessos. Dessa forma foi possível visualizar na microscopia a formação desse tipo de alteração.

3. Resultados

3.1. Produção do plasmídeo vacinal pcDNAXa1 e da proteína XA1r

Os oligonucleotídeos utilizados na PCR foram eficazes na amplificação total do gene *Xa1*, que corresponde a 1068 pares de bases (pb) (Fig. 1A). Após a ligação do gene *Xa1* ao plasmídeo pcDNATM3.1(+), a construção do plasmídeo vacinal pcDNAXa1 foi confirmada por sequenciamento automático e digestão enzimática, observando-se o desligamento do gene do plasmídeo (Fig. 1B). A presença de RNAm foi observada tanto *in vivo*, como *in vitro* por meio da RT-PCR, demonstrando a eficiência do funcionamento do plasmídeo vacinal em células eucarióticas. A proteína XA1r foi sintetizada em *E. Coli* Rosetta-gami, com um peso molecular de 22,11 kDa, confirmada por eletroforese em SDS-PAGE 15% (Fig. 2A) e *Western blot* (Fig 2B).

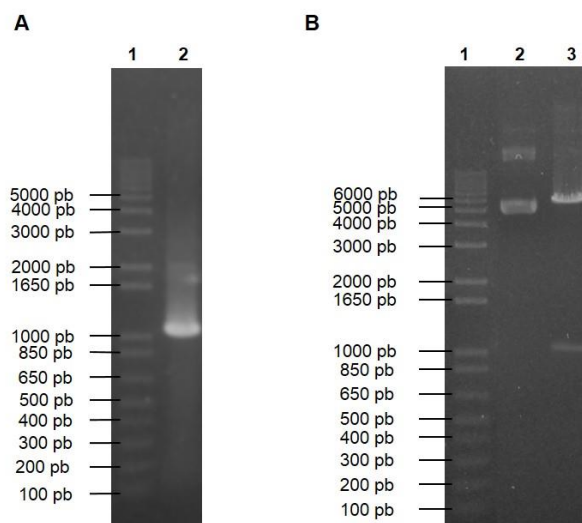


Fig. 1. Amplificação por PCR do gene *Xa1* e digestão do plasmídeo vacinal pcDNAXa1. (A). Eletroforese em gel de agarose 0,8% da PCR para amplificação do gene *Xa1* de *C. pseudotuberculosis*; na canaleta 1 marcador de pb 1 kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen®) e na canaleta 2 está a banda de amplificação do gene *Xa1* com 1068 pb. (B). Eletroforese em gel de agarose 0,8% da digestão enzimática do plasmídeo vacinal pcDNAXa1; na canaleta 1 marcador de pb 1 kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen®), na canaleta 2 está o plasmídeo vacinal pcDNAXa1 não digerido e na canaleta 3 está o plasmídeo vacinal digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xba*I (New England BioLabs®) onde observa-se a banda correspondente ao plasmídeo pcDNA™3.1(+) com aproximadamente 5366 pb (superior) e a banda correspondente ao gene *Xa1* desligado do plasmídeo com 1068 pb (inferior).

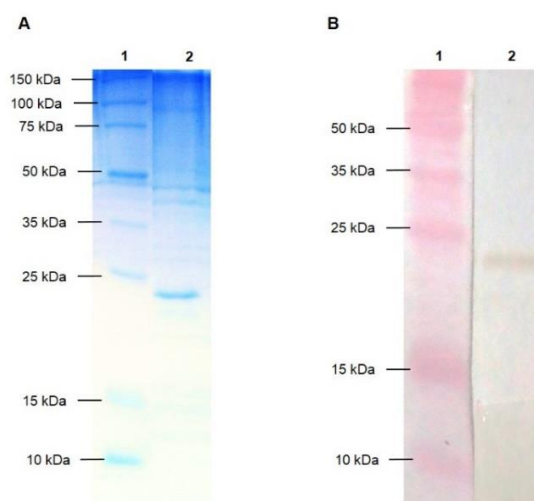


Fig. 2. Expressão da gene *Xa1* para a síntese da proteína XA1r. (A). Eletroforese em SDS-PAGE 15% da proteína XA1r; na canaleta 1 marcador de peso molecular de proteínas em kDa *Broad Range Protein Molecular Weight Markers* (Promega®) e na canaleta 2 está a banda correspondente a proteína XA1r purificada (22,11 kDa). (B). *Western blot* da proteína XA1r; na canaleta 1 marcador de peso molecular de proteínas em kDa *Broad Range Protein Molecular Weight Markers* (Promega®), na canaleta 2 está a banda correspondente à proteína XA1r purificada.

3.2. Resposta imune humoral

Os níveis de IgG e de seus isotipos, IgG1 e IgG2a, de cada camundongo foram avaliados por ELISA indireto, tendo como antígeno a proteína XA1r. Para analisar a progressão da indução de IgG nos grupos, foi necessário coletar amostras de sangue, para obtenção dos soros, nas pré-imunizações (dias 0, 15 e 30) e no pré-desafio (dia 50), totalizando quatro coletas. Na Fig. 3, observa-se a cronologia das imunizações a partir da média da DO de cada grupo. No dia 30 houve um significativo aumento na indução de IgG no grupo XA1r-Montanide, imunizado com a proteína XA1r. Quando comparado aos outros grupos, obteve diferença significativa ($P < 0,05$). No dia 50 o grupo XA1r-Montanide ainda se destacava com altos níveis de produção de IgG ($P < 0,05$), quando comparado aos outros grupos. Nesse mesmo período, o grupo pcDNAXa1+XA1r-Montanide também obteve diferença significativa ($P < 0,05$) com relação aos outros grupos. Não foram identificados níveis de IgG significativos no grupo pcDNAXa1 e nos grupos controles positivos 1002 e Bacterina.

Os níveis de IgG1 e IgG2a foram determinados com os soros obtidos da coleta do dia 50. A Fig. 4A representa o resultado dos níveis desses isotipos, um dia antes do desafio. Os níveis de IgG1 ($P < 0,05$) e IgG2a ($P < 0,05$) estavam visivelmente maiores no grupo XA1r-Montanide em relação aos outros grupos, pois apresentaram alta reação específica para XA1r utilizada como antígeno no ELISA indireto. Observa-se assim uma alta antigenicidade e imunogenicidade dessa proteína. Os demais grupos não obtiveram níveis significativos desses isotipos.

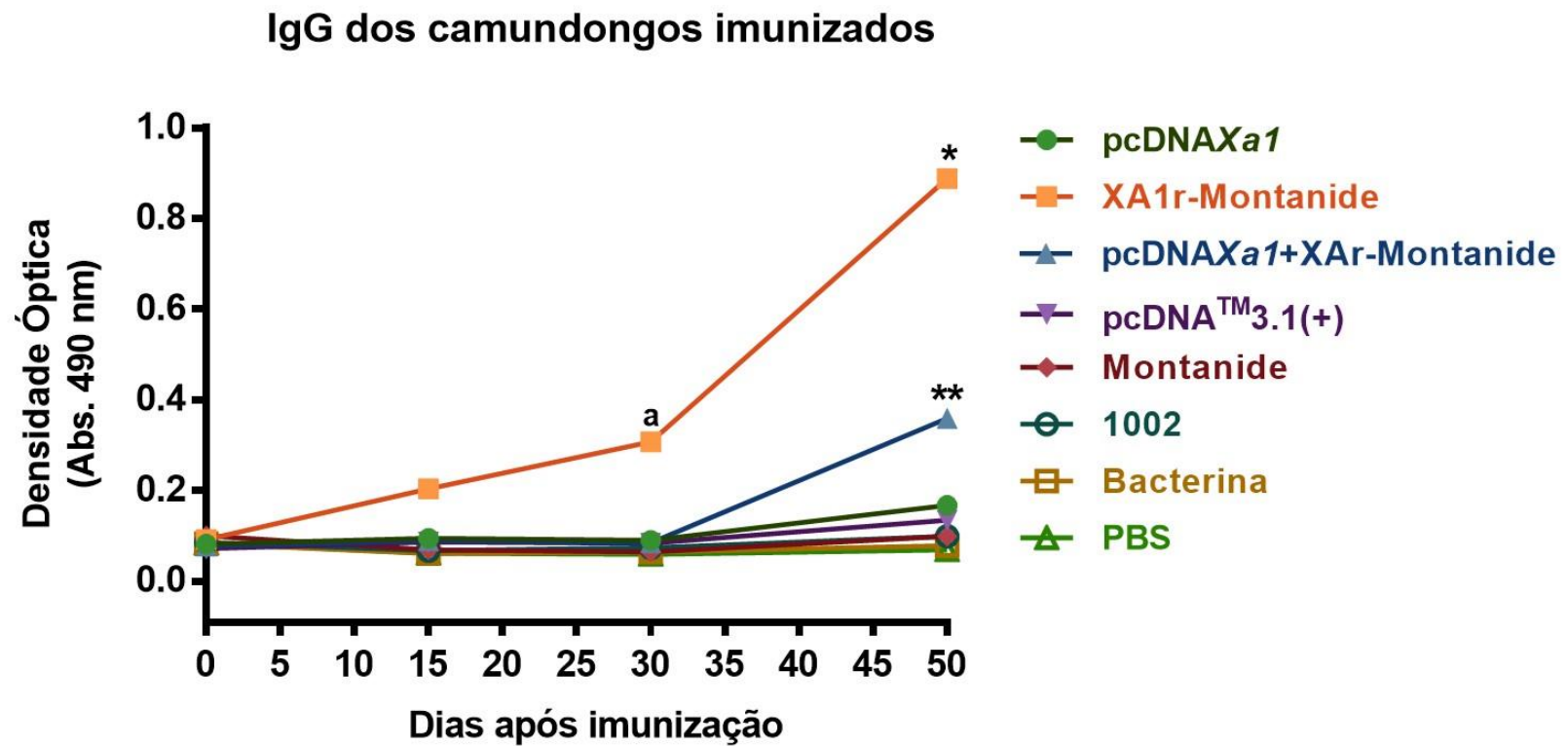


Fig. 3. Detecção por ELISA indireto de IgG específico para o antígeno XA1r, nos camundongos imunizados. Cinética da indução de IgG representada pelas DO's médias de cada grupo, a cada período após as imunizações. Os símbolos “a” no dia 30, * no dia 50 e ** no dia 50 demonstram a diferença significativa ($P < 0,05$).

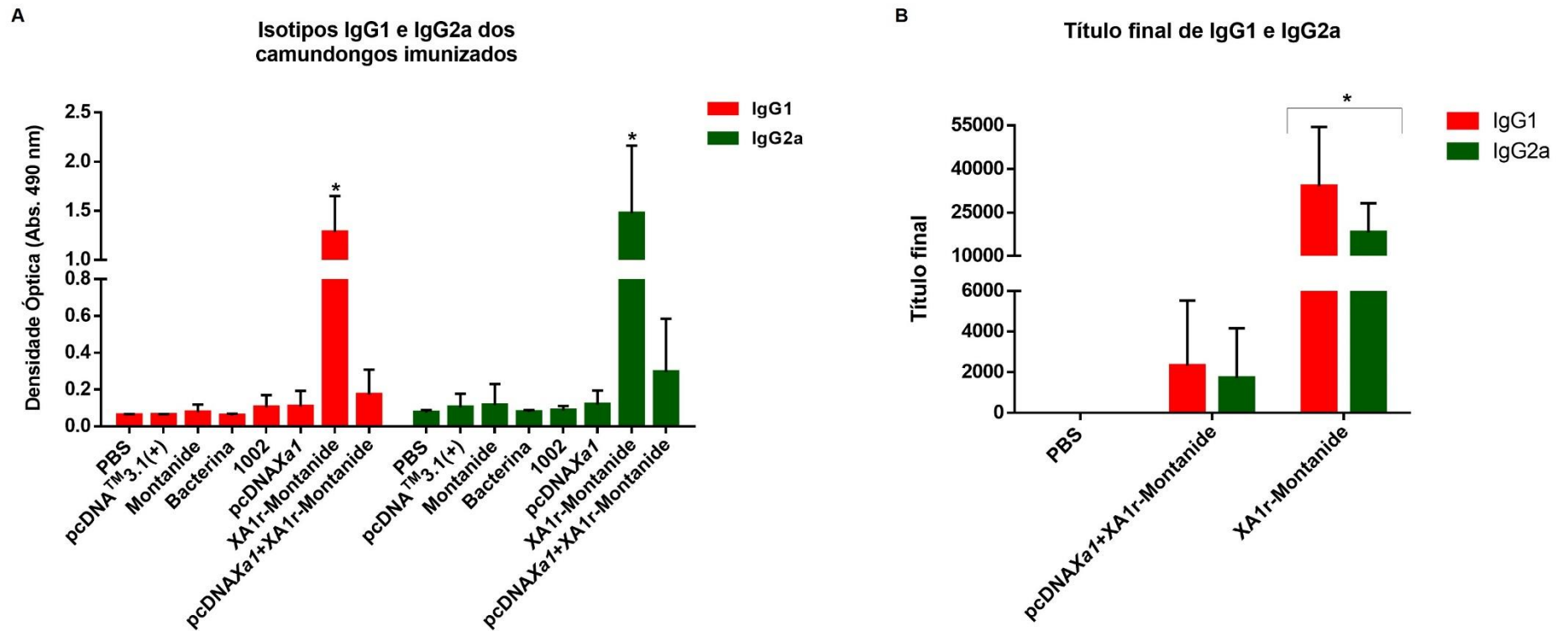


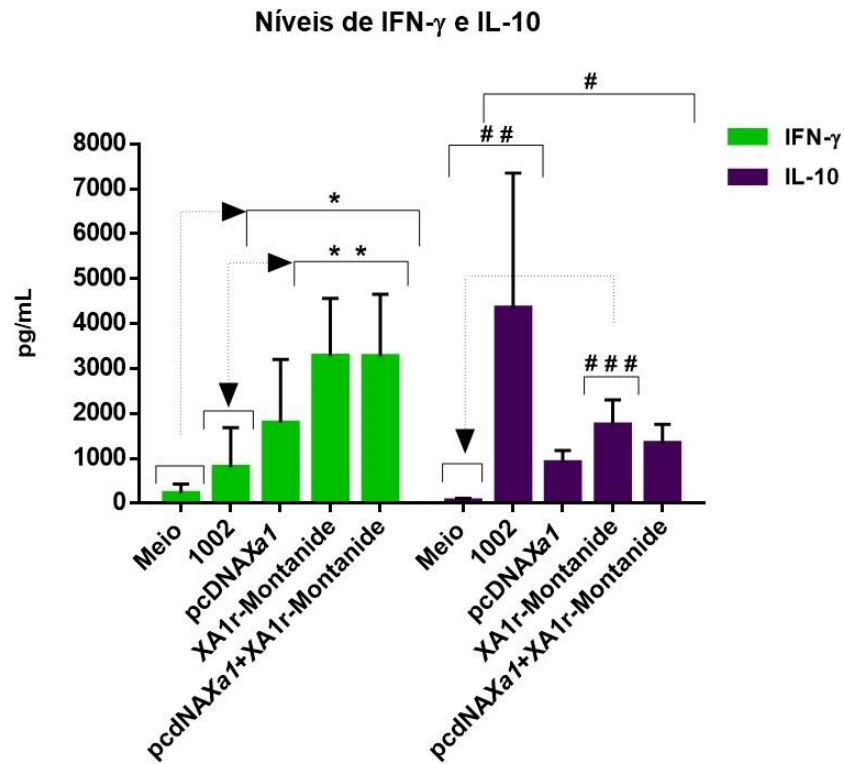
Fig. 4. Detecção por ELISA indireto dos isotipos IgG1 e IgG2a específicos para o antígeno XA1r, nos camundongos imunizados. (A) Níveis de IgG1 e IgG2a nos soros dos camundongos no dia anterior ao desafio (dia 50) com *C. pseudotuberculosis*. O símbolo *, tanto para IgG1 como IgG2a, demonstra diferença significativa ($P < 0,05$), quando comparadas as médias de cada grupo para cada isotipo. (B) Título final dos isotipos IgG1 e IgG2a nos soros dos camundongos no dia 50. Estão representadas as DO's médias de cada grupo com seus respectivos desvios padrões. O símbolo * demonstra diferença significativa ($P < 0,0001$), quando comparadas as médias entre os títulos de IgG1 e IgG2a.

Os grupos PBS, pcDNAXa1+XA1r-Montanide e XA1r-Montanide foram selecionados para o ELISA de título final de IgG1 e IgG2a (Fig.4B). O grupo PBS foi selecionado por ser o grupo controle; o pcDNAXa1+XA1r-Montanide foi selecionado por apresentar os maiores níveis de IgG1 e IgG2a depois do grupo XA1r-Montanide, mesmo não sendo níveis significativos; já o grupo XA1r-Montanide foi quem apresentou altos níveis dos dois isotipos. Para analisar se houve diferença significativa entre os isotipos de IgG dentro de cada grupo selecionado, a titulação foi realizada e as médias comparadas. Observou-se que apenas o grupo XA1r-Montanide apresentou diferença significativa entre IgG1 e IgG2a ($P < 0,0001$) e, ao contrário do apresentado na Fig. 4A onde IgG2a parecia ter maiores níveis do que IgG1, os maiores títulos foram observados para o isotipo IgG1 (Fig. 4B).

3.3. Resposta imune celular

A concentração das citocinas IFN- γ e IL-10 foram determinadas por ELISA de captura, utilizando o sobrenadante da cultura de esplenócitos. Esses foram estimulados, anteriormente, com a proteína XA1r. Para o ELISA foram selecionados apenas os grupos das formulações candidatas à vacinas contra LC e o grupo que recebeu a vacina comercial composta pela cepa viva atenuada 1002 de *C. pseudotuberculosis*. Com isso, foi possível detectar a presença de resposta celular, bem como comparar as concentrações das citocinas IFN- γ e IL-10 entre os grupos.

A



B

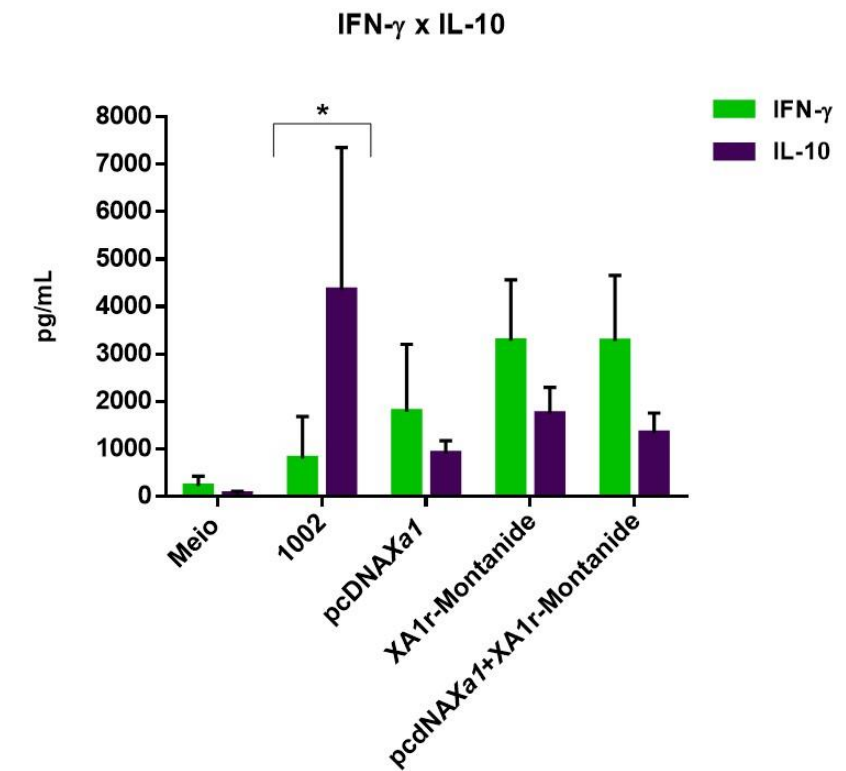


Fig. 5. Determinação da concentração das citocinas IFN- γ e IL-10, no dia 50, por ELISA de captura. (A) Médias dos níveis de produção das citocinas IFN- γ e IL-10. Os símbolos * e ** indicam que houve diferença significativa ($P < 0,05$). Para IL-10, os símbolos #, ## e ### indicam a diferença significativa ($P < 0,05$). (B) Comparação entre as médias das concentrações das citocinas IFN- γ e IL-10. O símbolo * indique que houve diferença significativa ($P < 0,0001$).

Houve resposta celular mediada por IFN- γ , com diferença significativa ($P < 0,05$) dos grupos XA1r-Montanide e pcDNA $Xa1$ +XA1r-Montanide com relação ao grupo 1002 (Fig. 5A). Ainda na Fig. 5A, observa-se o perfil da concentração de IL-10 em que houve uma maior produção no grupo 1002, apresentando diferença significativa ($P < 0,05$) quando comparado aos grupos das formulações candidatas à vacinas. Na Fig. 5B nota-se que as formulações vacinais deste estudo não apresentaram diferença significativa entre IFN- γ e IL-10. O único grupo que apresentou diferença significativa ($P < 0,0001$) foi o 1002.

3.4. Avaliação das alterações clínicas e anatomopatológicas na determinação da dose desafio

A dose desafio foi definida em 1×10^5 UFC, pois em um período de observação de 30 dias, esta causou alterações consideráveis nos camundongos, quando comparados aos camundongos dos outros grupos e principalmente ao grupo PBS. Com 7 dias de observação, foi possível identificar a pelagem eriçada de todos os animais deste grupo. Ao redor do 15º dia de observação, alguns animais do grupo 1×10^5 já apresentavam sinais de inapetência, consumpção, desidratação e apatia. Ocorreram óbitos de todos os animais, sendo que o último sobrevivente foi eutanasiado aos 30 dias por apresentar apatia severa.

No grupo 1×10^4 essas alterações clínicas não foram observadas e todos os animais permaneceram com um bom estado clínico durante os 30 dias. No grupo 1×10^6 , todos os animais vieram a óbito antes do 7º dia de observação, o que inviabilizou a escolha dessa dose pois as manifestações clínicas foram muito severas e rápidas.

Evidentemente, no grupo controle PBS, todos os animais permaneceram saudáveis, o que possibilitou sua comparação com os demais grupos.

Na necropsia, os animais do grupo 1×10^5 apresentaram alterações anatomopatológicas, como: formação de pequeno nódulo no abdômen, no local em que foi injetada a cepa CP 28033 de *C. pseudotuberculosis* intraperitoneal; hepatomegalia; alteração de coloração hepática, para pálida; esplenomegalia; pequenos nódulos brancos nas superfícies renais; formação de abscessos hepáticos, esplênicos e mesentéricos. Nos animais do grupo 1×10^4 não observou-se alterações anatomopatológicas visíveis macroscopicamente. Nos animais do grupo 1×10^6 também não foram detectadas alterações, pelo fato da rapidez em que os óbitos ocorreram, bem como nos animais do grupo PBS, que apresentavam órgãos saudáveis, servindo assim como padrão de comparação na necropsia.

3.5. Estado clínico, contagem de óbitos, de sobreviventes e alterações anatomopatológicas no pós desafio dos camundongos imunizados

Para avaliar a proteção das formulações vacinais originadas do gene *Xa1*, foi necessário acompanhar, no período de 30 dias após o desafio com a cepa CP 28033 de *C. pseudotuberculosis*, o estado clínico dos animais de cada grupo. Em geral todos os animais de cada grupo ao 7º dia pós desafio, apresentavam pelagem eriçada e nódulo abdominal no local da injeção de 1×10^5 UFC de *C. pseudotuberculosis*. Desse período até por volta do 15º dia pós desafio, a maioria dos animais apresentava os sinais clínicos da LC experimental como inapetência, consumpção, desidratação e apatia, principalmente dos grupos controles, como PBS e Montanide.

A partir desse período óbitos ocorreram. Mesmo assim, por volta do 15º dia foram observados que alguns animais nos grupos pcDNAXa1, XA1r-Montanide e pcDNAXa1+XA1r-Montanide, começavam a apresentar melhora no estado clínico, onde foram observados que a pelagem já estava em condições normais e o nódulo abdominal havia regredido. Não havia apatia nos animais desses grupos. Notou-se que esses animais voltaram a se alimentar e ingerir água normalmente, quando comparados aos animais dos grupos controles que não faziam o mesmo normalmente. O mesmo foi notado em animais dos grupos controles positivos 1002 e Bacterina. Isso resultou em uma melhora na condição corporal desses animais. A Fig.6 demonstra o estado clínico de alguns animais ao 30º dia de observação pós desafio.

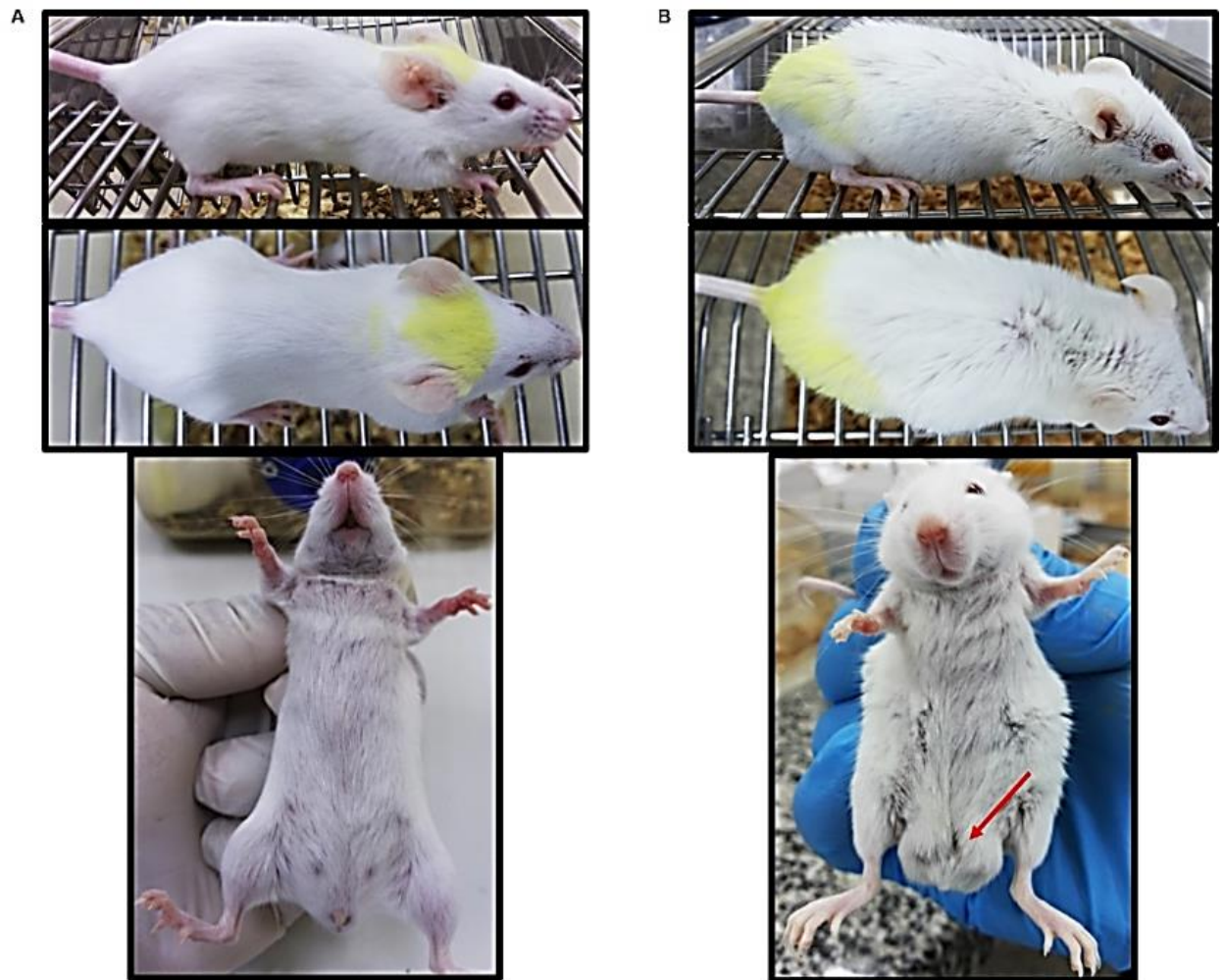


Fig. 6. Comparativo amostral de camundongos imunizados, sem e com manifestações clínicas de LC. (A) Perfil dos animais, imunizados, e desafios com *C. pseudotuberculosis* apresentando-se saudáveis ao final da observação (30º dia). Percebe-se, principalmente, a pelagem não eriçada. (B) Condição clínica de alguns camundongos imunizados e desafiados, que vieram a óbito ou que chegaram vivos ao 30º de observação. A seta vermelha indica o nódulo formado no abdômen, causado pela administração intraperitoneal de *C. pseudotuberculosis* no desafio.

As alterações clínicas consideradas foram inapetência, consumpção, desidratação, apatia o que geralmente estavam associadas às alterações anatomopatológicas como formação de abscessos em mesentério, microabscessos em rins, hepatomegalia e em alguns casos abscessos e esplenomegalia, detectados na necropsia. As alterações anatomopatológicas estão representadas na Fig. 7. Todos

os animais que vieram a óbito apresentavam algum tipo de alteração clínica e anatomopatológica, principalmente formação de abscessos em rins e fígado (Fig. 7B).

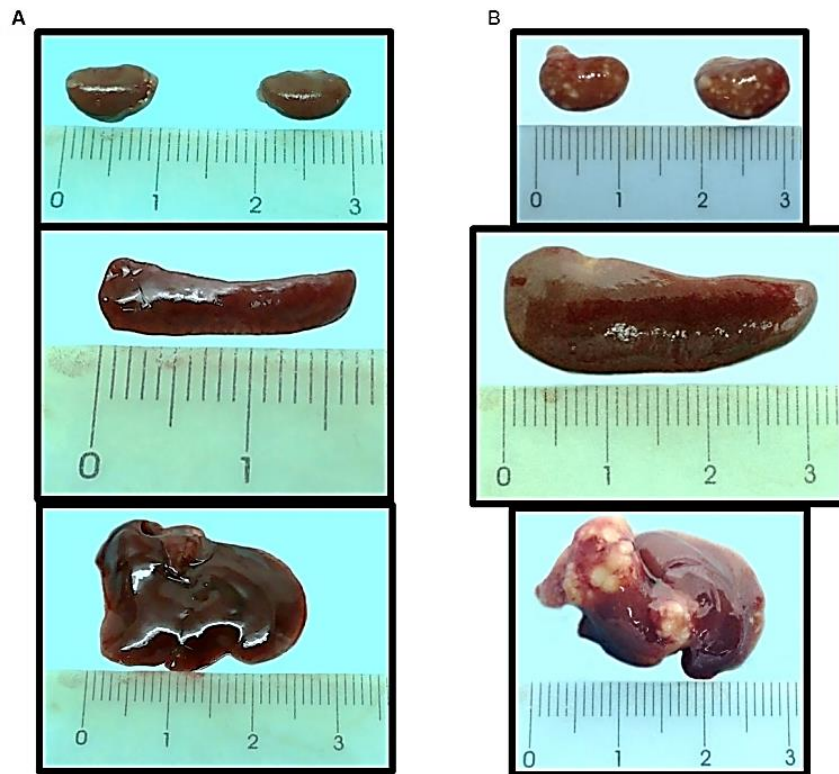


Fig. 7. Exemplo de órgãos sadios e órgãos com alterações anatomopatológicas causadas pela LC em camundongos. (A) De cima para baixo, o exemplo de rins, baço e fígado de camundongos sadios. (B) De cima para baixo, rins, baço e fígado com alterações macroscópicas causadas por *C. pseudotuberculosis* após o desafio.

A Fig. 8 representa como foram apresentadas as alterações patológicas em nível microscópico, de camundongos sem alterações e com alterações de LC. Na Fig. 8B, representa a formação de abscesso, caracterizado pela área de necrose central e intensa presença de células inflamatórias ao redor no fígado. A Fig. 8F retrata a formação de abscesso no córtex renal, também com presença de células inflamatórias. Em baços com esplenomegalia foi observado que havia congestão, representada pelo acúmulo de hemácias na polpa vermelha (Fig. 8D). Na Fig. 9, está representado um corte histológico de abscesso corado em HE, onde há formação da

região de necrose delimitada por células inflamatórias mononucleares e pela cápsula de colágeno sendo característico de abscessos de LC. Nos abscessos analisados foram observados um misto de necrose caseosa, por causa da presença de células gigantes (Fig. 9C) e mononucleares, bem como necrose liquefativa devido a presença de neutrófilos (Fig. 9B) e polimorfonucleares. As Figs. 9D e 9E demonstram a presença de *C. pseudotuberculosis* (em azul escuro) no abscesso, coradas por Gram histológico.

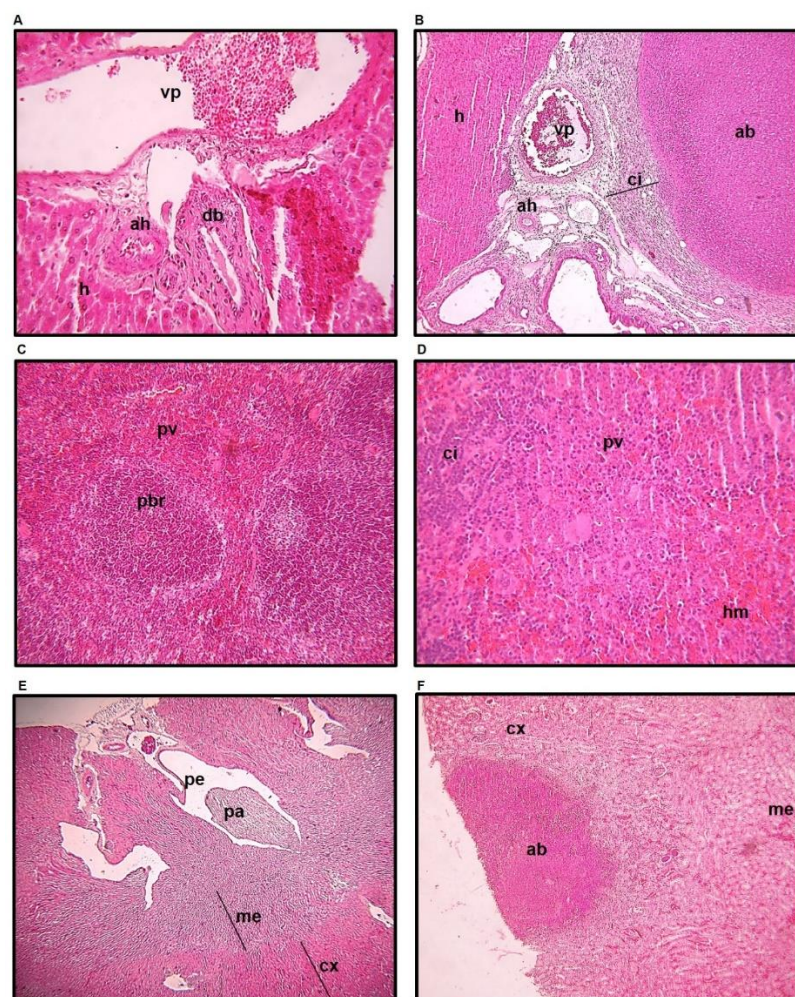


Fig. 8. Fotomicrografias representativas de fragmentos de tecidos de camundongos saudáveis e/ou acometidos pela LC. (A) Fígado sadio, HE, 400x (vp – veia porta; db – ducto biliar; ah – artéria hepática; h – hepatócitos). (B) Fígado acometido, HE, 100x (vp – veia porta; ah – artéria hepática; h – hepatócitos; ci – células inflamatórias; ab - abscesso). (C) Baço sadio, HE, 200x (pv – polpa vermelha; pbr – polpa branca). (D) Baço acometido, HE, 400x (pv – polpa vermelha; ci – células inflamatórias; hm – hemácias). (E) Rim sadio, HE, 40x (pe – pelve; pa – papila; me – medula; cx – córtex). (F) Rim acometido, HE, 100x (ab – abscesso; cx – córtex; me – medula).

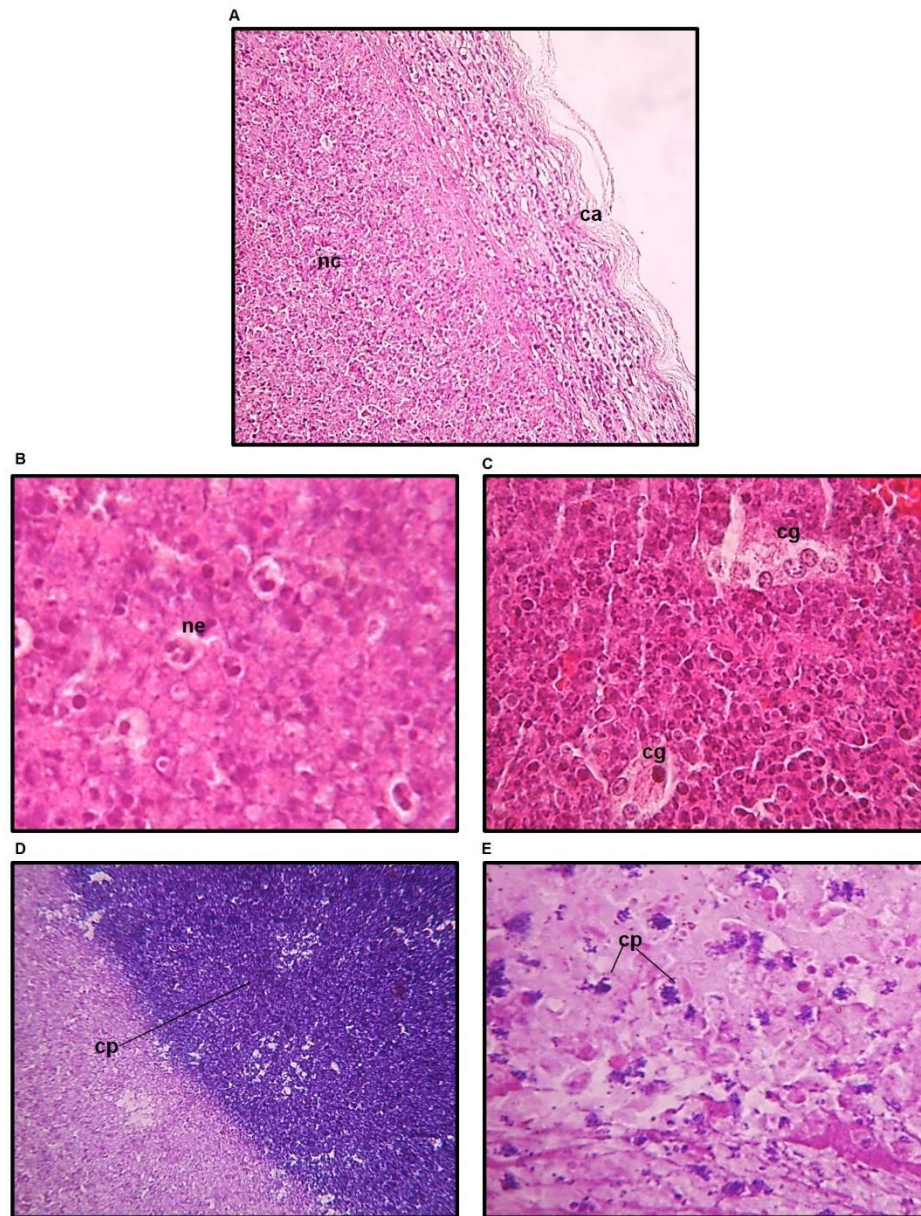


Fig. 9. Fotomicrografias de fragmentos de abscesso de camundongo acometido pela LC. (A) Abscesso, HE, 400x (nc – região de necrose caseosa e liquefativa; ca – cápsula). (B) Abscesso, HE, 1000x (ne – neutrófilo). (C) Abscesso, HE, 1000x (cg – células gigantes). (D) Abscesso, Gram histológico, 400x (cp – colônias de *Corynebacterium pseudotuberculosis*). (E) Abscesso, Gram histológico, 1000x (cp – colônias de *Corynebacterium pseudotuberculosis*).

Ao final da observação dos grupos, no 30º dia, o número de óbitos e sobreviventes foram contabilizados. Os grupos PBS, pcDNATM3.1(+), Montanide e Bacterina apresentaram 60% de óbitos e 40% de sobreviventes. Os grupos pcDNAXa1, XA1r-Montanide e pcDNAXa1+XA1r-Montanide obtiveram 40% de óbitos

e 60% de sobreviventes, sendo que o mesmo perfil foi observado para o grupo da vacina comercial 1002 (Fig. 10). Ainda na Fig. 10 está representada também a quantidade de camundongos, por grupo, que apresentaram essas alterações. Embora os grupos PBS, pcDNATM3.1(+) e Montanide apresentaram sobreviventes, os mesmos apresentaram sinais clínicos e alterações anatamopatológicas, assim como os que vieram a óbito antes do 30º dia. Dessa forma, nesses grupos, 100% dos animais tinham alterações clínicas e anatomopatológicas de LC detectadas nas necropsias. O grupo Bacterina apresentou 80% de alterações de LC, sendo que um desses animais chegou ao 30º dia vivo. Os grupos 1002 e pcDNAXa1+XA1r-Montanide apresentaram o mesmo perfil de alterações de LC, ou seja, os dois grupos obtiveram 60% sendo que dois animais desse montante foram a óbito antes do 30º dia e um desses animais viveu por todo o período. Nos grupos pcDNAXa1 e XA1r-Montanide as alterações foram evidentes somente nos animais que foram a óbito antes do 30º dia (40%), os demais (60%) chegaram vivos ao final e sem alterações de LC experimental.

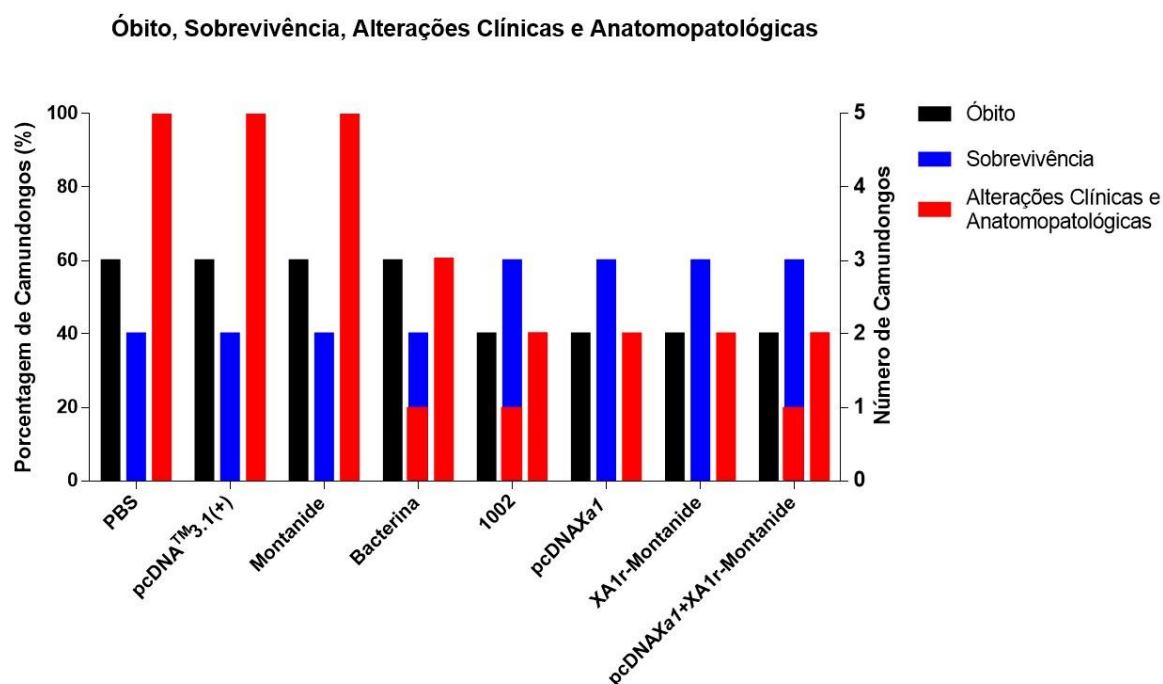


Fig. 10. Quantitativo de óbitos, sobreviventes e acometidos por alterações anatomopatológicas após desafio a cepa CP 28033 de *C. pseudotuberculosis*, dos camundongos imunizados. Os dados apresentados são referentes ao período de observação até o 30º dia pós-desafio, para avaliação da proteção após as imunizações.

4. Discussão

O gene *Xa1* foi identificado como sintetizador de uma proteína antigênica, a partir de uma imunovarredura de biblioteca genômica de *C. pseudotuberculosis* com soros de ovinos positivos para LC (dados submetidos para publicação). Com isso, este estudo foi o primeiro a avaliar o gene *Xa1* de *C. pseudotuberculosis*, nas formulações vacina de DNA e subunidade, como potencial gerador de resposta imune e proteção contra LC experimental em camundongos. Estes são considerados como os principais modelos/ferramentas experimentais, em virtude de ser um animal pequeno, de poder ser mantido em espaços reduzidos, e por possuir um período de gestação curto. Além disso, camundongos infectados com *C. pseudotuberculosis*

apresentam sinais clínicos, perfil de hemograma e bioquímica sérica, bem como as alterações histopatológicas em órgãos viscerais similares aos observados em pequenos ruminantes naturalmente infectados por este microrganismo [13]. Essas alterações histopatológicas foram observadas em camundongos deste estudo, principalmente com realação à formação de abscessos, que foram característicos de LC (Fig. 9).

Estudos relataram que em 15 e 24 horas após a inoculação com *C. pseudotuberculosis* em camundongos, houve alterações histopatológicas caracterizadas por formações de microabscessos próximo ao local da injeção [13,14]. No presente estudo alguns camundongos desafiados com a cepa CP 28033 e que desenvolveram LC, independente a qual grupo pertencesse, começaram a apresentar alterações anatomopatológicas por volta do 15º dia após o desafio. Dessa forma, na histologia foi possível visualizar a formação de abscessos principalmente em fígado e rins (Figs. 8B e 8F).

Na microscopia notou-se a presença de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e células gigantes principalmente na formação dos abscessos, caracterizando a necrose caseosa. No centro necrótico haviam neutrófilos degenerados formando piócitos, o que caracteriza a necrose liquefativa (Figs. 9A, 9B e 9C). A presença dessas células inflamatórias na formação de abscessos em LC foi relatado por Lan et al. [15]. A presença de *C. pseudotuberculosis* foi confirmada pelo método de Gram histológico em cortes de abscessos (Figs. 9D e 9E). Em um estudo essa bactéria foi identificada em cortes histológicos pela coloração de HE [16].

Foi identificado que a vacina de DNA pcDNAXa1, a vacina de subunidade XA1r (com adjuvante montanide) e o *booster* pcDNAXa1+XA1r-Montanide, geraram resposta imune a ponto de proteger camundongos contra *C. pseudotuberculosis*.

Esses grupos obtiveram integrantes ao final do período de observação (30 dias pós-desafio com 1×10^5 UFC de CP 28033 virulenta) sem alterações clínicas e anatomopatológicas características de LC. O mesmo ocorreu com o grupo positivo da cepa vacinal comercial 1002. Ao contrário dos grupos controles negativos (PBS, Montanide e pcDNATM3.1(+)) que apresentaram sobreviventes pós desafio mas todos com alterações de LC ao final de 30 dias. O grupo controle positivo Bacterina chegou ao final com dois sobreviventes, sendo que um apresentava alterações (Fig.10).

Sabe-se que a proteína XA1 é responsável pela aquisição de ferro, obtido do hospedeiro, para o metabolismo de *C. pseudotuberculosis* [2]. Este fator da dependência do ferro está relacionado com a virulência desta bactéria, pois ele é necessário para que diversas funções bacterianas sejam desempenhadas, principalmente para a geração de energia [17]. Billington et al [2], ressaltou ainda que as proteínas do *operon Xa* possuem características hidrofóbicas por possuírem similaridades com proteínas captadoras de ferro de *E. Coli*. Essa informação corroborou quando a proteína XA1r foi sintetizada para este estudo, onde em alguns procedimentos para sua análise, como a quantificação e para a realização dos ELISAs indiretos, foi necessária a sua solubilização.

As vacinas de DNA, ou vacinas de terceira geração, representam uma nova fronteira nas tecnologias vacinais e estão emergindo como um novo e importante método de proteção contra enfermidades em animais. O uso de vacinas de DNA como estratégia na profilaxia e tratamento de diversas infecções, pode gerar uma memória de resposta imune a longo prazo. Elas são capazes de desencadear respostas imunes humoral (Th2) e celular (Th1), gerando uma proteção mais eficaz [18,19].

Sendo *C. pseudotuberculosis* uma bactéria intracelular facultativa, a resposta imune modulada por células Th1 seria a mais adequada. Essas células são linfócitos

T CD4⁺, que após a apresentação de um antígeno via complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II e atuação de IL 12, produzidas por macrófagos, tornam-se efetoras. A partir disso, Th1 produz IFN- γ , que atua na ativação de macrófagos aumentando sua capacidade de destruição da *C. pseudotuberculosis*, após a fagocitose. O IFN- γ também atua em linfócitos B para diminuir a produção de IgG1 e aumentar a produção de IgG2a em camundongos. IgG2a pode ativar o sistema complemento e também atuar na opsonização da bactéria, para facilitar a fagocitose pelos macrófagos. Essa imunoglobulina é importante no combate à bactérias como *C. pseudotuberculosis*, pois ela possui uma alta capacidade de responder à polissacarídeos, que estão presentes em grande quantidade na parede celular de bactérias Gram-positivas. Nota-se que a produção de IgG2a está relacionada com a presença de IFN- γ durante a infecção, em camundongos [20–28].

Neste estudo o plasmídeo vacinal pcDNAXa1 não foi capaz de estimular uma resposta imune humoral significativa, estimulando baixos níveis de IgG1 e IgG2a (Fig. 4A). Mas ao observamos a Fig. 10, nos deparamos com um dado interessante, pois no grupo que recebeu esse plasmídeo vacinal houveram sobreviventes sem alterações clínicas e anatomopatológicas de LC, tal qual exemplificados nas Figs. 6A e 7A. O mesmo foi observado no grupo pcDNAXa1+XA1r-Montanide. Neste caso, a explicação seria uma resposta celular mediada por células T CD4⁺. Em camundongos Balb/c, vacinados contra *Staphylococcus aureus*, com uma vacina multivalente, foi observado que à baixos níveis de IgG a atuação de células T CD4⁺ foi eficiente para promover a proteção contra *S. aureus* e aumentar o tempo de sobrevivência de alguns animais [29].

Analisando o perfil de IFN- γ gerado nos grupos pcDNAXa1 e pcDNAXa1+XA1r-Montanide (Fig. 5A), foi possível destacar que houve resposta celular, modulada por Th1, capaz de gerar proteção em alguns indivíduos desses grupos, o que promoveu a sobrevivência destes sem as alterações típicas de LC (Fig. 10). Isso fica ainda mais evidente quando a presença de IFN- γ nesses dois grupos não difere significativamente do grupo XA1r-Montanide, que obteve maiores níveis de IgG2a. Dessa forma, a vacina de DNA, com e sem *booster* de proteína, gerou resposta celular contra *C. pseudotuberculosis*. A presença de células inflamatórias observadas na histologia, como em tecidos de baço e fígado por exemplo, reforça a atuação celular para combater a bactéria (Figs. 8B e 8D).

Uma vacina de DNA pode ter sua ação, de estímulo da resposta imune, aumentada. Essa melhora da ação pode estar relacionada com a forma de entrega do DNA vacinal à célula eucariótica. O plasmídeo vacinal pode ser envolto por nanocápsulas carreadoras, que o protege das ações enzimáticas das células e o entrega ao núcleo com uma maior integridade possível. Sendo assim, haverá uma maior produção proteica originada deste DNA vacinal, a partir das células do hospedeiro [30]. Outro fator que pode influenciar na potencialização da resposta imune a partir de uma vacina de DNA é a rota de administração. Uma vacina de DNA a partir do gene *pld* de *C. pseudotuberculosis*, foi inoculada por via subcutânea e intramuscular em ovinos. Por via subcutânea a vacina induziu um nível de proteção baixo, em comparação com a via intramuscular, que gerou uma resposta de IgG2 significativamente maior em relação aos animais não vacinados [31].

Existe ainda outra via de modulação da resposta imune, contra esse tipo de bactéria, a partir da diferenciação de T CD4⁺ em célula Th2 em resposta ao estímulo por IL-4. Elas são capazes de produzir IL-10 que estimulam também a diferenciação

de linfócitos B em plasmócitos para produzirem IgG, favorecendo assim o desenvolvimento da resposta humoral. A presença de IL-10 também pode resultar no bloqueio da ativação de macrófagos, a partir do impedimento da atuação do IFN- γ . Por isso IL-10 é conhecida como citocina imunorreguladora. Em resumo, Th1 modula a resposta celular e Th2 a resposta humoral [28,32–36].

O grupo XA1r-Montanide, obteve uma forte resposta Th2 caracterizada pelos altos títulos de IgG1, com diferença significativa quando comparada aos títulos de IgG2a (Fig. 4B). Vacinas de subunidade proteica geralmente induzem resposta imune modulada por Th2, indicada pela presença de altos níveis de IgG1. Esse anticorpo tem alta capacidade de reconhecer antígenos proteicos. Pode ocorrer também o reconhecimento direto da subunidade proteica, por ser um elemento extracelular, por linfócitos B. Após isso, esses linfócitos tornam-se ativados e começam a secretar anticorpos específicos contra essa subunidade. Esses anticorpos podem ser da classe IgG, e podem atuar na neutralização e opsonização de antígenos facilitando a fagocitose e destruição dos mesmos. Essa interação do linfócito B com a subunidade proteica também gera linfócitos B de memória. Quando ocorre uma segunda dose da vacina de subunidade, a resposta será mais rápida pela atuação das células B de memória [21,26,37–39].

Entretanto, a XA1r foi capaz de induzir também uma resposta Th1, observada pela produção de IFN- γ (Fig. 5B). Vacinas de subunidade proteica podem também gerar resposta Th1. Para isso, essa subunidade proteica é fagocitada por APC's, processada em peptídeos e apresentada como antígenos por moléculas do MHC. Quando esses peptídeos são apresentados via MHC de classe II à células T CD4⁺, as mesmas podem se diferenciar em células Th1 ou Th2. Quando diferenciam-se em

Th1, essas produzem IFN- γ , que desencadeia a ativação da resposta imune celular, como já descrito anteriormente [28].

Observou-se a partir desses dados, relacionados à formulação XA1r-Montanide, que essa subunidade proteica foi capaz de gerar uma resposta imune mista, ou seja, modulada por células Th1 e Th2. Camundongos imunizados com a proteína HSP60r, contra *C. pseudotuberculosis*, obteve o mesmo perfil misto de resposta imune. Entretanto, a HSP60r não foi capaz de proteger o animais após o desafio. Isso pode ter ocorrido devido à ação imunorreguladora de IL-10 que bloqueou a atuação de IFN- γ [40]. A presença de IL-10 (Fig. 5), tanto no grupo XA1r-Montanide como nos grupos pcDNAXa1 e pcDNAXa1+XA1r-Montanide, não impediu totalmente a ação do IFN- γ . Isso é evidenciado a partir do momento em que esses três grupos apresentaram camundongos sobreviventes sem alterações clínicas e anatamopatológicas (Fig. 10).

É importante ressaltar o uso de adjuvantes para vacinas de subunidade pois, eles estimulam células fagocíticas a capturarem a subunidade proteica, para serem apresentadas às células T como antígenos. Existem vários tipos de adjuvantes, porém o selecionado para acompanhar a XA1r neste estudo foi o Montanide. Ele é um adjuvante emulsificante baseado em água e óleo, considerado um grande estimulador da resposta imune em camundongos [10]. Adjuvantes emulsificantes promovem uma liberação lenta da subunidade proteica no organismo. Isso ocorre por causa da formação de granuloma no local da injeção. Isso promove um estímulo à formação de resposta imune a longo prazo [41,42].

As formulações vacinais demonstradas neste estudo, baseadas no gene *Xa1* de *C. pseudotuberculosis*, foram capazes de induzir resposta imune e também de proteger os camundongos contra o desafio com uma cepa virulenta. As formulações

vacinais com o plasmídeo pcDNAXa1, que induziu uma resposta imune celular; com o *booster* pcDNAXa1+XA1r-Montanide, que também estimulou uma resposta celular; e com a formulação de subunidade XA1r-Montanide, caracterizada neste estudo por estimular uma resposta imune mista, ou seja, celular e humoral; todas foram capazes de promover a sobrevivência da maioria dos integrantes de seus respectivos grupos. Isso foi evidenciado principalmente pela não presença de alterações clínicas e anatomopatológicas nos sobreviventes desses grupos. Nos grupos controles negativos foi observado o oposto, ou seja, os sobreviventes apresentavam todas as alterações de LC.

Embora os achados sobre a resposta imune gerada nesses camundongos imunizados não possam ser extrapolados para outras espécies de animais, esses resultados são animadores. A forma das lesões (abscessos) causadas por *C. pseudotuberculosis* na LC em camundongos é muito semelhante às que ocorrem em ovinos e caprinos. Desta forma o modelo murino reflete uma realidade aproximada do desenvolvimento da LC, o que nos possibilitou realizar este estudo com as candidatas vacinais contra *C. pseudotuberculosis*. Ajustes em doses, formas de entrega vacinal e rotas de administração podem ser realizadas em estudos posteriores, mas mesmo assim com esses resultados pode-se projetar um estudo com essas formulações candidatas a vacinas em ovinos e caprinos contra LC.

Agradecimentos

Agradecemos à técnica Maria Goretti dos Santos (Embrapa Gado de Corte) pelo apoio dado às execuções deste estudo. À Dr^a. Gisele Brazilliano de Andrade

(Universidade Católica Dom Bosco - UCDB) pelo apoio com os estudos anatomopatológicos, assim como aos acadêmicos de medicina veterinária da UCDB Matheus de Souza Santana e Alanderson Rodrigues que nos auxiliaram no desenvolvimento deste estudo. À toda equipe do laboratório de engenharia genética animal da Embrapa Gado de Corte. Aos órgãos financiadores Embrapa Gado de Corte, Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul – FUNDECT, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

Referências

- [1] Songer JG, Beckenbach K, Marshall MM, Olson GB, Kelley L. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am J Vet Res* 1988;49:223–6.
- [2] Billington SJ, Esmay P a., Songer JG, Jost BH. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 2002;208:41–5. doi:10.1016/S0378-1097(01)00573-0.
- [3] Baird GJ, Fontaine MC. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. *J Comp Pathol* 2007;137:179–210. doi:10.1016/j.jcpa.2007.07.002.
- [4] Dorella FA, Pacheco LGC, Oliveira SC, Miyoshi A, Azevedo V. *Corynebacterium pseudotuberculosis* : microbiology , biochemical properties , pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet Res* 2006;37:201–18. doi:10.1051/vetres.
- [5] Chaplin PJ, De Rose R, Boyle JS, Mcwaters P, Kelly J, Tennent JM, et al. Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect Immun* 1999;67:6434–8.
- [6] Ribeiro OC, Silva JAH, Oliveira SC, Meyer R, Fernandes GB. Dados preliminares sobre uma vacina viva contra a linfadenite caseosa.pdf. *Pesqui Agropecuária Bras* 1991;26:461–5.
- [7] Zhang Y, Praszker J, Hodgson A, Pittard AJ. Molecular analysis and characterization of a broad-host-range plasmid, pEP2. *J Bacteriol* 1994;176:5718–28.

- [8] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *J Biol Chem* 1951;193:265–75. doi:10.1016/0304-3894(92)87011-4.
- [9] Zuberer DA. Recovery and enumeration of viable bacteria. *Methods Soil Anal. Part 2—Microbiological Biochem. Prop.*, 1994, p. 119–44.
- [10] Miles AP, McClellan HA, Rausch KM, Zhu D, Whitmore MD, Singh S, et al. Montanide ® ISA 720 vaccines: quality control of emulsions, stability of formulated antigens, and comparative immunogenicity of vaccine formulations. *Vaccine* 2005;23:2530–9. doi:10.1016/j.vaccine.2004.08.049.
- [11] Luna L. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3rd ed. New York: mcgraw-Hill Book Co; 1968.
- [12] Unicamp. Técnicas histológicas empregadas no departamento de anatomia patológica- FCM UNICAMP 2011. <http://www.fcm.unicamp.br/deptos/anatomia/tecnicashistologicas.html#t16>.
- [13] Jesse FF., Sang SL, Saharee A., Shahirudin S. Pathological Changes in the Organs of Mice Model Inoculated with *Corynebacterium pseudotuberculosis* Organism. *Pertanika J Trop Agric Sci* 2011;34:145–9.
- [14] Pépin M, Pardon P, Lantier F, Marly J, Levieux D, Lamand M. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs: Kinetics of bacterial dissemination and inflammation. *Vet Microbiol* 1991;26:381–92. doi:10.1016/0378-1135(91)90031-A.
- [15] Lan DT, Makino S, Shirahata T, Yamada M, Nakane a. Tumor necrosis factor alpha and gamma interferon are required for the development of protective immunity to secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *J Vet Med Sci* 1999;61:1203–8.
- [16] Souza MDF, de Carvalho AQ, Garino F, Riet-Correa F. Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba. *Pesqui Vet Bras* 2011;31:224–30. doi:10.1590/S0100-736X2011000300007.
- [17] Litwin CM, Calderwood SB. Role of Iron in Regulation of Virulence Genes. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:137–49.
- [18] Gurunathan S, Wu C, Freidag BL, Seder RA. DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. *Curr Opin Immunol* 2000;12:442–7.
- [19] Babiuk LA. Review Vaccination: A Management Tool in Veterinary Medicine. *Vet J* 2002;164:188–201. doi:10.1053/tvjl.2001.0663.
- [20] Barrett DJ, Departments EMA, Microbiology I. IgG2 subclass restriction of antibody to pneumococcal polysaccharides. *Clin Exp Immunol* 1986;63:127–34.

- [21] Ferrante A, Beard LJ, Feldman RG. IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. *Pediatr Infect Dis J* 1990;9:516–24.
- [22] Abed NS, Chace JH, Fleming AL, Cowdery JS. Interferon- γ regulation of B lymphocyte differentiation: activation of B cells is a prerequisite for IFN- γ -mediated inhibition of B cell differentiation. *Cell Immunol* 1994;153:356–66.
- [23] Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004;75:163–89. doi:10.1189/jlb.0603252.Journal.
- [24] Motomura Y, Kitamura H, Hijikata A, Matsunaga Y, Matsumoto K, Inoue H, et al. The transcription factor E4BP4 regulates the production of IL-10 and IL-13 in CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 2011;12:450–9. doi:10.1038/ni.2020.
- [25] Guillemins M, Bruhns P, Saeys Y, Hammad H, Lambrecht BN. The function of Fc γ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nature* 2014;14:94–108. doi:10.1038/nri3582.
- [26] Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol* 2014;5:1–17. doi:10.3389/fimmu.2014.00520.
- [27] Su X, Yu Y, Zhong Y, Giannopoulou EG, Hu X, Liu H, et al. Interferon- γ regulates cellular metabolism and mRNA translation to potentiate macrophage activation. *Nat Immunol* 2015;16:838–49. doi:10.1038/ni.3205.
- [28] Vazquez MI, Catalan-dibene J, Zlotnik A. Cytokine B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. *Cytokine* 2015;74:318–26.
- [29] Monaci E, Mancini F, Lofano G, Bacconi M, Tavarini S, Sammiceli C, et al. MF59- and al (Oh) 3 -adjuvanted *Staphylococcus aureus* (4c-staph) vaccines induce sustained protective humoral and cellular immune responses , with a critical role for effector cD4 T cells at low antibody titers. *Front Immunol* 2015;6. doi:10.3389/fimmu.2015.00439.
- [30] Bhakta G, Nurcombe V, Maitra A, Shrivastava A. Results in Immunology DNA-encapsulated magnesium phosphate nanoparticles elicit both humoral and cellular immune responses in mice. *Results Immunol* 2014;4:46–53.
- [31] Rose R De, Tennent J, Mcwaters P, Chaplin PJ, Wood PR, Kimpton W, et al. Efficacy of DNA vaccination by different routes of immunisation in sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;90:55–63.
- [32] De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, Vries JE de. Interleukin 10(EL, 10) Inhibits Cytokine Synthesis by Human Monocytes: An Autoregulatory Role of IL-10 Produced by Monocytes. *J Exp Med* 1991;174:1209–20.

- [33] Burdin N, Banchereau J. B-Cell-Derived IL-10: Production and Function. *Methods A Companion to Methods Enzymol* 1997;11:98–111.
- [34] Isler P, Rochemonteix BG De, Songeon F, Boehringer N, Nicod LP. Interleukin-12 Production by Human Alveolar Macrophages Is Controlled by the Autocrine Production of Interleukin-10. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:270–8.
- [35] Corinti S, Albanesi C, Sala A, Pastore S, Girolomoni G. Regulatory Activity of Autocrine IL-10 on Dendritic Cell Functions 1. *Am Assoc Immunol* 2001.
- [36] Zouain CS, Gustavson S, Oliveira SC, Azevedo V, Alves JB, Goes AM. The role of IL-10 and IgG1 in the protection and granulomatous response in *Schistosoma mansoni* P24-immunized mice. *Vaccine* 2001;19:1218–24.
- [37] Jefferis R, Kumararatne DS, Medical B. Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance. *Clin Exp Immunol* 1990;81:357–67.
- [38] Chen Y, Wang S, Yang W, Chen Y, Lin H, Shiuan D, et al. Expression and Immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* Heat Shock Protein Antigen P42 by DNA Vaccination. *Infect Immun* 2003;71:1155–60. doi:10.1128/IAI.71.3.1155.
- [39] Galli V, Simionatto S, Marchioro SB, Fisch A, Gomes CK, Conceic FR, et al. Immunisation of mice with *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens P37 , P42 , P46 and P95 delivered as recombinant subunit or DNA vaccines. *Vaccine* 2012;31:135–40. doi:10.1016/j.vaccine.2012.10.088.
- [40] Pinho MJR, Dorella FA, Coelho K da S, Fonseca CT, Cardoso FC, Meyer R, et al. 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. *Open Vet Sci J* 2009;3:22–7.
- [41] Mohan T, Verma P, Rao DN. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development : A road ahead. *Indian J Med Res* 2013;138:779–95.
- [42] Pany SS, Mohanty NN, Sarangi LN, Mohapatra JK, Shivachandra SB. Review Article Vaccination: a Future Perspective. *Adv Anim Vet Sci* 2015;3:1–8.