



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

LENISE MARIA PARENTE MOTA

**Avaliação da resposta imune humoral em ovinos inoculados com rCP40 de
Corynebacterium pseudotuberculosis associada ao Bacilo de Calmette-Guérin (BCG)
contra linfadenite caseosa**

MOSSORÓ

2024

LENISE MARIA PARENTE MOTA

**Avaliação da resposta imune humoral em ovinos inoculados com rCP40 de
Corynebacterium pseudotuberculosis associada ao Bacilo de Calmette-Guérin (BCG)
contra linfadenite caseosa**

Monografia apresentada a Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Silvestre
Brilhante Bezerra

MOSSORÓ

2024

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

MM917 Mota, Lenise Maria Parente .
a Avaliação da resposta imune
humoral em ovinos inoculados com rCP40 de
Corynebacterium pseudotuberculosis associada
ao Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) contra
linfadenite caseosa
/ Lenise Maria Parente Mota. -
2024.
37 f. : il.

Orientador: Francisco
Silvestre Brilhante
Bezerra.
Monografia (graduação) -
Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso
de Biotecnologia,
2024.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

LENISE MARIA PARENTE MOTA

**Avaliação da resposta imune humoral em ovinos inoculados com rCP40 de
Corynebacterium pseudotuberculosis associada ao Bacilo de Calmette-Guérin (BCG)
contra linfadenite caseosa**

Monografia apresentada a Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Defendida em: 18 / 04 / 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Silvestre Brilhante Bezerra (UFERSA)
Presidente

Prof(a). Dra. Aline Lidiane Batista (UFERSA)
Membro Examinador

Prof(a). Dra. Andréa de Fátima Silva Rezende (IFS)
Membro Examinador

Dedico esta monografia aos meus entes queridos Zaira Barbosa Parente, Raimunda Alves Parente e João Ingrisson Diógenes do Nascimento, que não puderam estar presentes, mas que torceram por mim e ajudaram em cada momento que estiveram vivos.

À minha família, que sempre acreditou e esteve comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família e amigos por todo apoio, amor e compreensão, e por acreditarem em mim até quando eu não acreditei. Vocês foram incríveis em todos os momentos.

Agradeço ao professor Silvestre por expandir meu conhecimento e me ajudar a evoluir como profissional. Nunca esquecerei do quanto foi compreensivo e paciente.

Agradeço aos meus parceiros de laboratório, especialmente os que estiveram comigo durante todo o processo, pela companhia, cumplicidade e conselhos dados.

Agradeço à amizade de Pedro, Juliana, Adrielle, Bia, Márcio, Karol, Thiago e Gabriel por terem ouvido inúmeras vezes as minhas aflições, compreenderem, acolherem e estarem presentes.

Agradeço ao meu amor, Alexandre, por ter colaborado tanto para minha evolução como pessoa e não ter medido carinho, atenção e risadas.

RESUMO

A Linfadenite Caseosa (LC) é uma doença crônica que costuma afetar pequenos ruminantes. Esta é causada pelo agente infeccioso *Corynebacterium pseudotuberculosis*, uma bactéria gram-positiva e intracelular facultativa. O cenário de tratamentos para essa infecção não é propício, já que a antibioterapia apresenta algumas limitações em seu uso, sendo as vacinas as opções mais viáveis no controle da LC. Nesse contexto, as vacinas recombinantes de subunidade demonstraram níveis de proteção satisfatórios contra a doença em modelo murino, todavia, os estudos com essas formulações nas espécies alvo são escassos. O presente trabalho tem como propósito a avaliação da resposta imune humoral de ovinos imunizados com a proteína recombinante rCP40 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e o *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur. Para isso, uma cepa específica de *E. coli* foi selecionada para obtenção da proteína, a partir da transformação dessa bactéria com o plasmídeo pAE/cp40. O cultivo se deu em meio LB líquido contendo ampicilina e a expressão foi induzida com IPTG. O *Western Blot* foi utilizado para confirmar a expressão da proteína em questão, que foi purificada por cromatografia de afinidade ao níquel. No que concerne a imunização, foram vacinados 12 ovinos, divididos randomicamente em 2 grupos: G1 (controle), inoculado com solução salina 0,9% e, G2, imunizado com a vacina contendo 200 µg da proteína recombinante (rCP40) e 10⁶ UFC de *M. bovis* BCG Pasteur em um volume final de 1 mL. Foi efetuada a coleta de sangue nos dias 0, 21, 49, 77, 105 e 133 do experimento para realização do ELISA indireto, padronizado através do método de *Checkerboard titration*, a fim de analisar a produção de anticorpos. Como resultados, observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) de IgG anti-rCP40 de forma sustentada a partir do dia 21 até o dia 133. Em relação a IgG anti-BCG, não houve aumento significativo em comparação ao grupo controle durante todo o experimento, contudo foi observado nos dias 49, 105 e 133 níveis maiores de IgGs anti-BCG no grupo vacinado. Em conclusão, a partir da análise constatou-se um aumento dos níveis de IgG anti-rCP40 de *C. pseudotuberculosis* de forma sustentada em ovinos imunizados, confirmando a hipótese de que a vacina aqui descrita permitiu o aumento da resposta imune humoral.

Palavras-chave: Vacina. Linfadenite caseosa. Ovinos. Imunidade.

ABSTRACT

Caseous Lymphadenitis (CL) is a chronic disease that usually affects small ruminants. This is caused by the infectious agent *Corynebacterium pseudotuberculosis*, a gram-positive and facultative intracellular bacterium. The treatment scenario for this infection is not favorable, as antibiotic therapy has some limitations in its use, with vaccines being the most viable options for controlling CL. In this context, recombinant subunit vaccines have demonstrated satisfactory levels of protection against the disease in a murine model, however, studies with these formulations in target species are scarce. The purpose of the present work is to evaluate the humoral immune response of sheep immunized with the recombinant protein rCP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur. For this, a specific strain of *E. coli* was selected to obtain the protein, from the transformation of this bacterium with the pAE/cp40 plasmid. Cultivation took place in liquid LB medium containing ampicillin and expression was induced by the IPTG. Western Blot was used to confirm the expression of the protein, which was purified by nickel affinity chromatography. Regarding immunization, 12 sheep were vaccinated, randomly divided into 2 groups: G1 (control), inoculated with 0.9% saline solution and, G2, immunized with the vaccine containing 200 µg of the recombinant protein (rCP40) and 10⁶ CFU of *M. bovis* BCG Pasteur in a final volume of 1 mL. Blood was collected on days 0, 21, 49, 77, 105 and 133 of the experiment to perform the indirect ELISA, standardized using the Checkerboard titration method, in order to analyze antibody production. As a result, a significant increase in IgG anti-rCP40 was observed in a sustained manner from day 21 to day 133. In relation to IgG anti-BCG, there was no significant increase compared to the control group throughout the experiment, however it was observed on days 49, 105 and 133 higher levels of anti-BCG IgGs in the vaccinated group. In conclusion, the analysis revealed a sustained increase in the levels of IgG anti-rCP40 of *C. pseudotuberculosis* in immunized sheep, confirming the hypothesis that the vaccine described here allowed an increase in the humoral immune response.

Keywords: Vaccine. Caseous lymphadenitis. Ovine. Immunity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – SDS PAGE a 12% da proteína recombinante rCP40 expressa em *Escherichia coli* BL21 Star e induzida por Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) 30
- Figura 2** – Níveis de anticorpos em ovinos antes e após inoculação destes com a proteína rCP40 de *C. pseudotuberculosis* e o adjuvante *M. bovis* BCG Pasteur durante os dias de experimento. Os soros dos animais foram coletados nos dias 0, 21, 49, 77, 105 e 133 para quantificação de IgGs anti-BCG (A) e anti-rCP40 (B) a partir do ELISA indireto na absorbância de 492 nm. O “*” demonstra diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e o vacinado 31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Célula Apresentadora de Antígeno
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
BHI	Brain Heart Infusion
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
LB	Luria Bertani
LC	Linfadenite caseosa
MED	Densidade de Epítipo Maduro
mrPD	Fosfolipase D mutante
NEPPER	Núcleo de Ensino e Pesquisa de Pequenos Ruminantes
OADC	Oleic Albumin Dextrose Catalase
PLD	Fosfolipase D
TLR	Receptor Toll-Like
UFC	Unidade formadora de colônias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	Linfadenite caseosa e caracterização da <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	18
2.2	Formulações vacinais comerciais	19
2.3	Vacinas recombinantes	20
2.4	Proteína rCP40	21
2.5	<i>Mycobacterium bovis</i> BCG no controle da LC.....	22
3	HIPÓTESES	24
4	JUSTIFICATIVA	25
5	OBJETIVOS DA PESQUISA	26
5.1	Objetivo geral	26
5.2	Objetivos específicos	26
6	METODOLOGIA	27
6.1	Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	27
6.2	Cultivo de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG	27
6.3	Cultivo de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	27
6.4	.Expressão e purificação da proteína rCP40	27
6.5	Animais experimentais e aspectos éticos	27
6.6	Experimentos de imunização e desafio	28
6.7	Padronização do ELISA indireto	28
6.8	Avaliação da resposta imune humoral	29
6.9	Análise estatística	29
7	RESULTADOS	30
7.1	Expressão e purificação da proteína rCP40	30
7.2	Padronização do ELISA indireto	30
7.3	Avaliação dos níveis de IgG	30
8	DISCUSSÃO	32
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
10	REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO

A Linfadenite Caseosa (LC) é uma doença crônica e infecciosa que afeta pequenos ruminantes, a exemplo de caprinos e ovinos. Caracteriza-se pelo surgimento de granulomas nos linfonodos superficiais e órgãos internos. A bactéria causadora desta infecção é a *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que é um organismo gram-positivo e intracelular facultativo (Parise *et al.*, 2021; EMBRAPA, 2014). Os animais acometidos por esta enfermidade podem apresentar queda da produção de leite e diminuição do peso, além da condenação da carcaça e danificação da pele, causando danos econômicos graves aos produtores dos rebanhos (Osman *et al.*, 2018).

Nesse contexto, a disseminação da LC é estimulada pela falta de medidas eficientes para o seu controle, além disso, os antibióticos comerciais disponíveis possuem algumas limitações, devido a inabilidade desses medicamentos penetrarem a cápsula do abscesso, e pela formação de biofilmes que dificultam o contato e a sua eliminação do organismo (Guedes *et al.*, 2015). Por sua vez, a adoção das vacinas comerciais como profilaxia, apesar de se mostrar uma alternativa vantajosa em relação aos antibióticos, também apresenta limitações, uma vez que não são capazes de conferir uma proteção satisfatória aos rebanhos contra a LC (Domínguez *et al.*, 2021).

Diante disso, os testes de novas formulações vacinais baseadas em proteínas recombinantes têm sido promissores, dado que camundongos submetidos a essa abordagem exibiram um elevado índice na produção de IgGs específicos, e também uma baixa nos sinais clínicos da doença (Silva *et al.*, 2014). Uma das proteínas mais estudadas é a CP40, inicialmente identificada como uma serina-protease, foi posteriormente definida como uma endoglicosidase de 40 kDa expressa durante a infecção por *C. pseudotuberculosis*, apresentando um importante papel na resposta imunológica (Walker *et al.*, 1995; Shadnezhad *et al.*, 2016).

As formulações vacinais envolvendo a rCP40 mostraram resultados significativos, como pode ser observado no uso da proteína combinada com a saponina, que conferiu 90% de proteção em camundongos após o desafio com a cepa MIC-6 (Silva *et al.*, 2014). Outro estudo pertinente demonstrou que uma formulação contendo 5 µg/mL de saponina com rCP40 chegou a proteger 100% dos animais do desafio com a cepa virulenta C57 de *C. pseudotuberculosis* (Droppa-Almeida *et al.*, 2016).

Ademais, o uso do bacilo Calmette-Guérin (BCG) em formulações vacinais implicou uma boa qualidade aos imunizantes por apresentar propriedades adjuvantes e produzir os marcadores imunológicos de proteção IgG e IFN- γ (Pinho *et al.*, 2021). Um exemplo disso

pode ser observado na expressão da proteína PLD pela *M. bovis* BCG, que garantiu uma taxa de sobrevivência de 77% aos camundongos desafiados com a cepa MIC-6 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, enquanto o uso do BCG não recombinante induziu uma taxa de proteção cruzada de 66% (Leal *et al*, 2018).

O presente projeto tem como propósito avaliar a resposta imune humoral em ovinos inoculados com a formulação vacinal composta da proteína rCP40 associada ao *M. bovis* BCG Pasteur.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. LINFADENITE CASEOSA E CARACTERIZAÇÃO DA *Corynebacterium pseudotuberculosis*

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença que afeta pequenos ruminantes, provocada pelo agente etiológico *Corynebacterium pseudotuberculosis*, uma bactéria gram-positiva e intracelular facultativa (Parise *et al.*, 2021). A LC é caracterizada pela formação de abscessos nos linfonodos superficiais e internos dos animais infectados, assim como também em outros órgãos (De Sá *et al.*, 2021). Em relação a forma externa dessa infecção, os linfonodos superficiais comprometidos geralmente são os submandibulares, pré-escapulares, parotídeos, poplíteos, pré-femorais, bem como os supramamários. Quanto à interna, pode-se citar os pulmões, o fígado e o baço como os principais órgãos afetados por esse microrganismo (Abdullah *et al.*, 2017).

O *C. pseudotuberculosis* é um actinomiceto que está incluído no filo Actinobacteria (NCBI, 2024) e que apresenta uma classificação que está relacionada a capacidade de atenuação do nitrato e predileção do hospedeiro pelo microrganismo, onde o biovar Ovis são cepas nitrato-negativas e infectam pequenos ruminantes, enquanto o biovar Equi corresponde às cepas nitrato-positivas e afetam equinos e bovinos (Oliveira *et al.*, 2016).

Muitos países apresentam casos de LC em ruminantes, a exemplo da Austrália, África do Sul e Brasil. Nesse contexto, a LC atinge a progressão econômica dos países que possuem como base a produção e venda de leite, pele e carcaças destes animais (Guimarães *et al.*, 2011). A alta disseminação desse microrganismo pode ser explicada por sua capacidade de permanência no ambiente por muito tempo, em decorrência da ruptura dos abscessos nos indivíduos infectados, mantendo-se viável durante 6 a 12 meses (Gascoigne *et al.*, 2020; Motta *et al.*, 2010).

As principais portas de entrada são feridas superficiais provindas da castração, marcação das orelhas, bem como também de traumas locais, facilitando a entrada da bactéria nos indivíduos, já que as secreções dos animais infectados podem atingir essas lesões (Dorella *et al.*, 2006). O contato dos animais com o *C. pseudotuberculosis* também pode ocorrer através da ingestão de alimentos ou água contaminados por esse patógeno (EMBRAPA, 2015).

Desse modo, algumas medidas preventivas são necessárias para contenção da doença, como o afastamento dos animais acometidos do restante do rebanho e higienização dos locais comumente frequentados por eles. Ademais, exames sorológicos são imprescindíveis na detecção da infecção, para que ocorra esse isolamento, sendo o ensaio imunoenzimático ELISA

usualmente utilizado para essa finalidade (Guedes *et al.*, 2015; Oreiby *et al.*, 2015).

Quanto ao uso de antibióticos, a *C. pseudotuberculosis* apresenta uma certa sensibilidade a alguns deles nos testes *in vitro*, porém a formação de biofilme e o contágio intracelular, como citado anteriormente, impedem que a ação desses fármacos seja, de fato, efetiva (Norman *et al.*, 2014; Guimarães *et al.*, 2011). Em vista disso, para controle da LC em um cenário onde a antibioterapia não é suficiente para contê-la, cirurgias são executadas para tratamento dos linfonodos superficiais, porém pode haver ruptura dos mesmos durante o processo. Além disso, o diagnóstico clínico incapaz de identificar a forma visceral da doença, permite que casos assintomáticos disseminem a *C. pseudotuberculosis* para os animais saudáveis. Nesse cenário, para contenção da LC, a melhor alternativa disponível é a utilização de vacinas (Santos *et al.*, 2016; EMBRAPA, 2014).

2.2. FORMULAÇÕES VACINAIS COMERCIAIS

As vacinas empregadas até o momento no controle da LC são variadas, ou seja, processos e compostos diferentes estão envolvidos nessas formulações. O uso das vacinas disponíveis comercialmente contra LC não são suficientes para eliminar a doença dos rebanhos (Dorella *et al.*, 2009).

Grande parte das vacinas comerciais em uso apresentam na sua composição toxóides, elaborados com a inativação da fosfolipase D (PLD) da *C. pseudotuberculosis* acrescida de antígenos provindos do gênero *Clostridium*, contudo também é observado o uso de cepas vivas atenuadas ou inativadas, sendo alguns exemplos dessas formulações a LinfoVac, Glanvac®, Biodectin® (Pinho *et al.*, 2021). A LinfoVac (Laboratórios Vencofarma do Brasil), é uma vacina comercial que apresenta cepas vivas atenuadas de *C. pseudotuberculosis* como imunógeno, sendo permitido seu uso no Brasil. Experimentos realizados em modelo murino com essa formulação mostraram que 80% dos camundongos foram protegidos (Domínguez *et al.*, 2022).

A Glanvac® por sua vez, apresenta 9 tipos de vacinas disponíveis no mercado, sendo a maioria das formulações produzidas na Austrália. A composição desses imunizantes se baseia em toxóides de *C. pseudotuberculosis* associados a toxóides e bacterinas de clostrídios (EMBRAPA, 2014). Em um estudo experimental, a Glanvac™ não foi capaz de impedir a propagação de bactérias inoculadas nos animais, para outras regiões além da área de inoculação do microrganismo, o que demonstra menor eficácia em relação às outras vacinas (Fontaine *et al.*, 2006).

Em relação a Biodectin®, esta é produzida pela Fort Dodge Animal Health (EUA)

estando disponível em vários países (Bastos *et al.*, 2012). Apresenta em sua composição quatro toxóides e duas culturas bacterianas tratadas com formalina, bem como um endectocida (Pinho *et al.*, 2021).

Ademais, uma outra vacina que possui destaque é a Caseous D-T (Colorado Serum, EUA), elaborada com toxinas oriundas de *Clostridium* e culturas de células que foram inativadas de *C. pseudotuberculosis* associadas com a PLD. Sua utilização permite a redução dos abscessos resultantes da LC, porém causa efeitos colaterais como dor e letargia em grande parte dos animais inoculados. Em paralelo, a vacina Case-Bac (Colorado Serum, EUA), composta pela fosfolipase D, é bastante utilizada em ovinos. Contudo, causa efeitos colaterais adversos nos animais vacinados, sendo proibida a administração desta vacina nos caprinos, já que pode causar convulsões e edemas ventrais (Domínguez *et al.*, 2022).

Além disso, as vacinas comerciais não podem ser administradas a todas as espécies infectadas por *C. pseudotuberculosis* e não há licenciamento para uso desses imunizantes em muitos países (Dorella *et al.*, 2009). Em suma, com os fortes indícios de uma imunização incompleta e as diferentes reações adversas que acometem os indivíduos imunizados, urge a incorporação de opções mais seguras para a imunização dos animais atingidos pela LC (Meyer *et al.*, 2002).

2.3. VACINAS RECOMBINANTES DE SUBUNIDADE

Com o advento da bioinformática e as novas abordagens adotadas neste campo de estudo, foi possível desenvolver imunizantes mais eficazes para controlar a LC, tendo como principal foco a produção de vacinas recombinantes (D' Afonseca *et al.*, 2008). A utilização dessas plataformas vacinais conferiu taxas de proteção de até 100%, que variaram conforme o antígeno e o adjuvante utilizados na formulação (Rezende *et al.*, 2020; Pinho *et al.*, 2009; Brum *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018; Droppa-Almeida *et al.*, 2016).

A obtenção das vacinas recombinantes de subunidade está estritamente ligada à tecnologia do DNA recombinante, que permitiu a inserção de genes estranhos em vetores para posterior introdução destes em “fábricas de produção”, a exemplo da bactéria *Escherichia coli*, para expressão de proteínas em abundância (Kalil *et al.*, 2008).

As proteínas rCP00660, rCP09720 e rCP01850 (anteriormente descritas como rCP0126, rCP1957 e rCP0369, respectivamente) são alvos promissores para o desenvolvimento de vacinas contra a LC. A escolha desses peptídeos foi realizada por meio da abordagem *in silico* denominada Densidade de Epítopo Maduro (MED), selecionando esses antígenos entre as 2.097 proteínas da *C. pseudotuberculosis* disponíveis (Rezende *et al.*, 2016).

A expressão dessas proteínas recombinantes foi utilizada em formulações vacinais para o teste em camundongos. A combinação entre rCP09720, rPLD e saponina conferiu uma proteção em modelo murino de 40%, enquanto o uso da esterase rCP09720 associada com hidróxido de alumínio gerou eficácia de 58,3%. Já a proteína rCP01850 combinada com hidróxido de alumínio não gerou nenhuma proteção aos camundongos testados, enquanto a associação à rPLD e saponina ou ao adjuvante própolis conferiram 50 e 70% de proteção, respectivamente (Silva *et al.*, 2018; Brum *et al.*, 2017; Rezende *et al.*, 2020; Bezerra *et al.*, 2020).

Outro estudo avaliou a utilização da proteína rCP40 e da cepa CP09 de *C. pseudotuberculosis* em camundongos, assim como também a sua combinação e associação com adjuvantes para proteção contra a LC. Foi observado que 30 dias após o desafio, o grupo que foi imunizado com rCP40 e saponina apresentou 90% de sobrevivência, enquanto o grupo que recebeu a rCP40 com o adjuvante saponina, por via intraperitoneal, e a cepa CP09, por via subcutânea, promoveu 70% de sobrevivência (Silva *et al.*, 2014).

Ademais, outro estudo apontou que a combinação de rCP40 com o adjuvante de Freund conferiu 100% de proteção em camundongos, ao passo que o grupo controle imunizado com o mesmo adjuvante apresentou apenas 60%, mostrando a potencialidade dessa proteína recombinante como vacina (Droppa-Almeida *et al.*, 2016).

2.4. PROTEÍNA RECOMBINANTE rCP40

As glicoproteínas apresentam um importante papel no que diz respeito à resposta imunológica (Rudd *et al.*, 2001). Nesse contexto, enzimas catalisadoras denominadas glicosidases aceleram o processo de hidrólise, transformando as ligações glicosídicas em cadeias glicanas. As glicosidases são divididas em exoglicosidases e endoglicosidases, responsáveis por cortar carboidratos terminais inseridos em estruturas glicanas e hidrolisar ligações no interior dessas cadeias, respectivamente (Garbe; Collin, 2012).

Diante do papel biológico dessas macromoléculas, Walker *et al.*, (1994) identificaram uma proteína de 40 kDa produzida e secretada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Essa proteína foi purificada a partir do sobrenadante do cultivo e demonstrou-se capaz de aumentar a proteção de ovinos acometidos pela linfadenite caseosa, quando usada como vacina. Os autores dividiram os animais em 3 grupos para administração de duas doses, onde o G1 recebeu 100 µg/mL de uma preparação da CP40 associado ao hidróxido de alumínio, o G2 inoculado com 5 µg/mL de CP40 e hidróxido de alumínio e o G3 apenas com o hidróxido de alumínio. Houve uma redução de 82% no que se refere à proporção de ovinos infectados com a *C.*

pseudotuberculosis e 98% das lesões pulmonares foram reduzidas nos animais do G1.

Anteriormente, acreditava-se que a CP40 era uma serina protease, devido às análises bioquímicas por zimografia de gelatina e uso de inibidores da atividade enzimática, porém estudos posteriores indicaram que a proteína supracitada é uma endoglicosidase, devido às semelhanças sequenciais com essa classe, apresentando atividade putativa em glicoproteínas hospedeiras (Shadnezhad *et al.*, 2016).

De acordo com os dados do Uniprot (2024) e ProtParam (2024), a endoglicosidase CP40 apresenta 379 aminoácidos em sua composição e o ponto isoelétrico teórico da mesma é de 6.43. Ademais, a bioinformática de montagem demonstrou que a proteína CP40 apresenta áreas hidrofóbicas que interagem com os receptores TLR2, que estão presentes nas células apresentadoras de antígenos (APCs), promovendo a ativação da resposta imunológica (Droppa-Almeida *et al.*, 2018).

Nesse cenário, a predição de epítomos é de extrema importância para o desenvolvimento de vacinas, visto que a partir da análise em questão é possível determinar potenciais alvos proteicos para essa finalidade (Sunita *et al.*, 2019). Estudos *in silico* anteriores a respeito de epítomos imunodominantes já haviam demonstrado o potencial imunogênico de algumas regiões da proteína CP40. Para avaliar o papel desse imunógeno na resposta imunológica, foi realizado o teste de ELISA utilizando soros positivos e negativos de ovinos para a LC, o que culminou no reconhecimento desses antígenos pelos anticorpos presentes nas amostras positivas (Droppa-Almeida *et al.*, 2021).

Além disso, predições a partir do Software BepiPred 2.0 identificaram a presença de 12 epítomos lineares de células B para o isolado 2J-L de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, bem como também foram apontados pelo programa ElliPro um total de 13 epítomos lineares e 3 conformacionais a partir da estrutura tridimensional da CP40 em formato PDB, demonstrando a relevância dessa proteína para produção de vacinas contra a LC (Domínguez *et al.*, 2023).

2.5. *Mycobacterium bovis* BCG NO CONTROLE DA LC

A *Mycobacterium bovis* é um bacilo gram-positivo, aeróbico, imóvel e de crescimento lento, responsável por causar a tuberculose em bovinos e acometer outros animais (Rodríguez-Morales; Castaneda-Hernández, 2019). A aplicação da *M. bovis* no controle da LC pode ser explicada pela relação filogenética com a *C. pseudotuberculosis*, o que permitiu a produção de uma vacina utilizando o bacilo Calmette-Guérin (BCG) para proteção de camundongos desafiados pela bactéria causadora da LC (Bahr *et al.*, 2011; LEAL *et al.*, 2018).

Nesse contexto, um estudo guiado por Eshra *et al.*, (2018) consistiu na distribuição de ovelhas em 3 grupos experimentais, sendo G1 submetido a uma dose de 0,1 mL de BCG por via intradérmica seguida de 2 mL de bacterina de *C. pseudotuberculosis* e adjuvante Montanide ISA 206 por via subcutânea, com repetição da dose após 21 dias. Por outro lado, o G2 recebeu apenas as duas doses da formulação vacinal composta pela bacterina e o óleo adjuvante, enquanto o G3 foi estabelecido como grupo controle. Na avaliação da resposta humoral, os grupos em questão apresentaram diferença significativa na produção de anticorpos e quanto à resposta celular, foi observada uma maior diferença ($p < 0,05$) entre o G1 e o G3.

Outro exemplo de formulação é visto na utilização do *Mycobacterium bovis* BCG como vacina vetorizada recombinante com capacidade de expressar a proteína rPLD, que atingiu 77% na taxa de sobrevivência e 88% quando o *M. bovis* BCG foi administrado com um reforço de rPLD na imunização de camundongos Balb/c. Além disso, houve produção significativa de IFN- γ pelos animais utilizados no experimento (Leal *et al.*, 2018).

Ademais, um experimento realizado por Selim *et al.*, (2010) se baseou na utilização de bacterina da *C. pseudotuberculosis* como imunógeno para inoculação de ovinos do grupo 1 (G1), mrPLD e bacterina como formulação para o G2, células de *C. pseudotuberculosis* mortas por irradiação gama para o G3, mrPLD associada ao *M. bovis* BCG para o G4 e adjuvante de óleo para o grupo controle (G5). Foram administradas duas doses por via subcutânea com intervalo de 21 dias entre elas. O uso da vacina formulada pela inativação genética da fosfolipase D recombinante (mrPLD) combinada à BCG foi capaz de gerar 66% de proteção aos ovinos utilizados na pesquisa, demonstrando ser uma boa alternativa para imunização.

Logo, salienta-se que o BCG é um alvo promissor para utilização em vacinas, já que apresenta propriedades adjuvantes, baixo custo na produção e níveis adequados de proteção e segurança quando administrados. Outro ponto importante a ser mencionado é o fato desse bacilo induzir respostas imunológicas do tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2), que são ideais para o controle da LC (Bastos *et al.*, 2009).

3. HIPÓTESES

A vacina formulada com a proteína rCP40 de *C. pseudotuberculosis* associada ao *M. bovis* BCG Pasteur é capaz de induzir níveis elevados e sustentados de anticorpos do tipo IgG em ovinos.

4. JUSTIFICATIVA

A proteína rCP40 já foi testada em modelo murino gerando níveis de proteção entre 90 e 100% em modelo murino (Silva *et al.*, 2014; Droppa-Almeida *et al.*, 2016) e também já foi avaliada na sua forma nativa (purificada a partir do sobrenadante do cultivo) em ovinos, gerando 82% de redução dos níveis de contaminação e 98% de redução das lesões pulmonares (Walker *et al.*, 1994). Entretanto, o antígeno de 40 kDa de *C. pseudotuberculosis* na forma recombinante ainda não foi testado em ovinos. Além disso, outro trabalho demonstrou que o uso somente de *M. bovis* BCG pasteur foi capaz de induzir proteção de 66% em camundongos desafiados com a cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis* (Leal *et al.* 2018), exercendo um grande potencial de imunização cruzada para a LC. Deste modo, o presente trabalho se justifica por investigar o potencial do uso da formulação vacinal composta por rCP40 associada ao *M. bovis* BCG na indução de uma resposta imune humoral elevada e sustentada contra a LC em ovinos.

5. OBJETIVOS DA PESQUISA

5.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a resposta imune humoral induzida pela formulação vacinal composta por rCP40 de *C. pseudotuberculosis* e *M. bovis* BCG em ovinos.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a expressão da proteína rCP40 na sua forma recombinante em sistema de expressão heterólogo;

- Efetuar o cultivo do *M. Bovis* BCG;

- Imunizar ovinos com a formulação vacinal contendo a proteína rCP40 e o *M. bovis* adjuvante BCG;

- Avaliar a resposta imune humoral gerada pela vacina recombinante.

6. METODOLOGIA

6.1. Cultivo de *Escherichia coli*

Em relação à cepa de *E. coli* (BL21 Star), o cultivo ocorreu em duas formas: em meio Luria-Bertani (LB) – Ágar, para o plaqueamento e crescimento das colônias recombinantes, em estufa bacteriológica durante o tempo de 16 horas a uma temperatura de 37°. E em meio LB líquido, para a expressão da proteína recombinante, em shaker orbital a 150 rpm. Em ambos os cultivos, foi adicionado o antibiótico ampicilina na concentração de 50mg/mL, objetivando a seleção do crescimento das colônias recombinantes.

6.2. Cultivo de *Mycobacterium bovis* BCG

A cepa *M. bovis* BCG Pasteur foi cultivada em meio Middlebrook 7H9 (Difco) acrescido de 10% de OADC (Oleic Albumin Dextrose Catalase), 0,2 % de glicerol e 0,05% de Tween 80. O cultivo foi realizado em estufa bacteriológica a 37 °C por aproximadamente 7 dias.

6.3. Cultivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Quanto ao cultivo da cepa MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*, foi utilizado o meio *Brain Heart Infusion* (BHI) para o crescimento das colônias em estufa bacteriológica a 37 °C, durante 16 horas. Foi acrescentado 0,05% do tensoativo Tween 80 no meio de cultura.

6.4. Expressão e purificação da proteína *rCP40*

O plasmídeo recombinante pAE/*cp40* foi previamente construído e cedido pela Profa. Dra. Sibele Borsuk da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Para a expressão heteróloga a cepa *E. coli* BL21 star foi transformada com a inserção desse plasmídeo pelo método do choque térmico usando CaCl₂ (100 mM), onde 1mM de Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) foi utilizado como indutor. Para confirmar a expressão da proteína recombinante, um *Western Blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-6X-His combinado com peroxidase (Sigma) foi realizado. A purificação da proteína se baseou no uso de uma coluna de sepharose (HisTrap) para a realização da cromatografia de afinidade ao níquel, sendo a pureza da *rCP40* verificada pelo uso do SDS-PAGE e a sua concentração pelo Kit BCA (Pierce).

6.5. Animais experimentais e aspectos éticos

O experimento envolveu o uso de 12 ovinos nativos, adquiridos de rebanhos sem a

presença de LC clínica, de ambos os sexos, entre 4 e 6 meses de idade. O ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) avaliou se os animais apresentavam IgG específica para *C. pseudotuberculosis* por meio do uso da proteína rCP40 (Droppa-Almeida *et al.*, 2021), sendo escolhidos para o estudo apenas os de resultado soronegativo. Os animais foram alojados nos piquetes do Núcleo de Ensino e Pesquisa de Pequenos Ruminantes (NEPPER) da Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA). Os ovinos foram vermifugados e passaram por uma quarentena de 30 dias antes do início da imunização para observações clínicas. No que se refere à alimentação, foram dispostos feno concentrado e suplementação mineral, bem como água *ad libitum*. Os experimentos que envolveram os animais estão em concordância com os Princípios Éticos na Experimentação Animal propostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (<http://www.cobea.org.br/etica.htm#3>). O presente projeto foi aprovado sob parecer 14/2022 da Comissão Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFERSA.

6.6. Experimentos de imunização e desafio

Os ovinos inclusos no experimento foram divididos em 2 grupos de 6 animais cada. A imunização se deu por via subcutânea, no qual o grupo controle (G1) recebeu uma dose de 1 mL de solução salina a 0,9% e o grupo 2 (G2) foi imunizado com 200 µg/dose de rCP40 (Rodrigues *et al.*, 2021) e 10⁶ UFC de *M. bovis* BCG Pasteur em um volume final de 1 mL (González-Sánchez *et al.*, 2018). Foram administradas duas doses com intervalo de 21 dias entre estas. Em relação ao desafio, este ocorreu no dia 49 do experimento, por via subcutânea, onde foi administrado nos animais 1 mL da cepa MIC-6 de *C. pseudotuberculosis* na concentração de 10⁵ UFC.

6.7. Padronização do ELISA indireto

Para aplicação do ELISA indireto, foi necessário realizar previamente a padronização desse teste a partir do método *checkerboard titration*, a fim de obter as melhores concentrações de antígeno, soro e anticorpo. Esse processo ocorreu em duas etapas, na primeira foram usados um pool positivo e um pool negativo, obtidos por meio das amostras de soro dos animais do grupo vacinado com a formulação vacinal contendo a rCP40 e *M. bovis* BCG e do grupo controle, respectivamente. As concentrações de proteína e do BCG testadas foram de 0,25, 0,50, 1 e 2 µg/mL, onde o diluente utilizado foi o tampão carbonato-bicarbonato, e para o soro, foram aplicadas as diluições de 1:400, 1:200, 1:100 e 1:50, sendo utilizado como agente o PBS-T + 1% de leite. Na segunda etapa, após obter-se a concentração ideal de proteína e BCG a ser utilizada, as mesmas

concentrações de soro foram testadas com diferentes concentrações do anticorpo conjugado (1:40.000, 1:20.000, 1:10.000 e 1:5.000), para definir as melhores concentrações de ambos.

6.8. Avaliação da resposta imune humoral

Quanto à avaliação dos animais, foram feitos exames com o intuito de observar a ocorrência de reações locais provenientes das vacinas. As coletas de sangue ocorreram nos dias 0, 21, 49, 77, 105 e 133, e um ELISA indireto foi realizado de acordo com a metodologia de Barral *et al.* (2019), com algumas modificações, para identificação dos níveis de IgG específicos para a proteína rCP40 e para o *M. bovis* BCG Pasteur, a fim de verificar o padrão da resposta imune humoral. Os poços das placas de 96 poços utilizados no experimento foram inicialmente sensibilizados com 100 µl da rCP40, previamente diluída em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6, durante 16 h a 4 °C. Posteriormente, procedeu-se três lavagens com PBS-T e bloqueio das placas com 200 µl de leite em pó diluído em PBS-T a 5% em cada poço por 2 h a 37 °C. Foram realizadas três lavagens com PBS-T e 50 µl das amostras de soro diluídas em PBS-T com leite em pó a 1% foram introduzidas nos poços e levadas à estufa a 37 °C e incubadas por 1h. O processo de lavagem foi repetido 3 vezes com PBS-T e foram adicionados 50 µl de anticorpo anti-ovino conjugado com peroxidase diluída - 1:10.000 em leite em pó com PBS-T a 1%. As placas foram incubadas a 37 °C durante 45 minutos. Houve cinco lavagens com PBS-T e utilização da solução de revelação (10 mL de citrato de potássio, 50 µl de H₂O₂, 0,3 g de OPD) por 15 min para reação. A parada se deu pelo uso de ácido sulfúrico a 5% e a leitura dos valores da densidade óptica foram adquiridos fotometricamente na absorbância de 492 nm.

6.9. Análise estatística

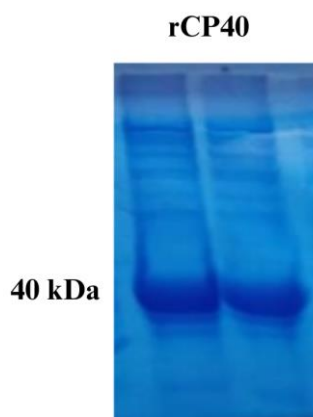
Diferenças entre os níveis de produção de IgG entre os grupos foram analisadas através do teste *Multiple t per row*. Previamente, testes de homogeneidade da produção de anticorpos foram realizados, sendo utilizado o Shapiro-Wilk Kolmogorov-Smirnov, a fim de verificar se os dados obtidos eram paramétricos ou não-paramétricos. Para análise, utilizou-se o programa GraphPad Prism versão 6 (GraphPad Software, San Diego, CA). Diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. Expressão e purificação da rCP40

A expressão heteróloga da proteína rCP40 no vetor *E. coli* BL21 Star (DE) alcançou resultados satisfatórios, haja vista a confirmação pelo método *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHis. Ademais, a partir da técnica de SDS-Page foi possível ratificar a purificação da proteína recombinante em questão, sendo visualizada no gel a presença de uma banda indicando o peso molecular de 40 kDa, como esperado. O rendimento final da rCP40 foi de 8,229 mg/L.

Figura 1. Identificação da proteína rCP40 pela técnica de SDS-Page realizada em duplicata.



7.2. Padronização do ELISA indireto

Quanto a padronização do teste ELISA indireto mediante *Checkerboard titration*, foi verificada a concentração ideal de 0,25 µg/mL para a proteína rCP40. Em relação às melhores concentrações para soro e anticorpo, foram alcançadas 1:50 e 1:5000, respectivamente. No que se refere à padronização utilizando o *M. bovis* BCG, foi possível notar que esta apresentou a mesma concentração de soro obtida pela rCP40, diferenciando-se apenas em relação à concentração de anticorpo – 1:10.000, e antígeno a ser sensibilizada na placa – 0,5 µg/mL.

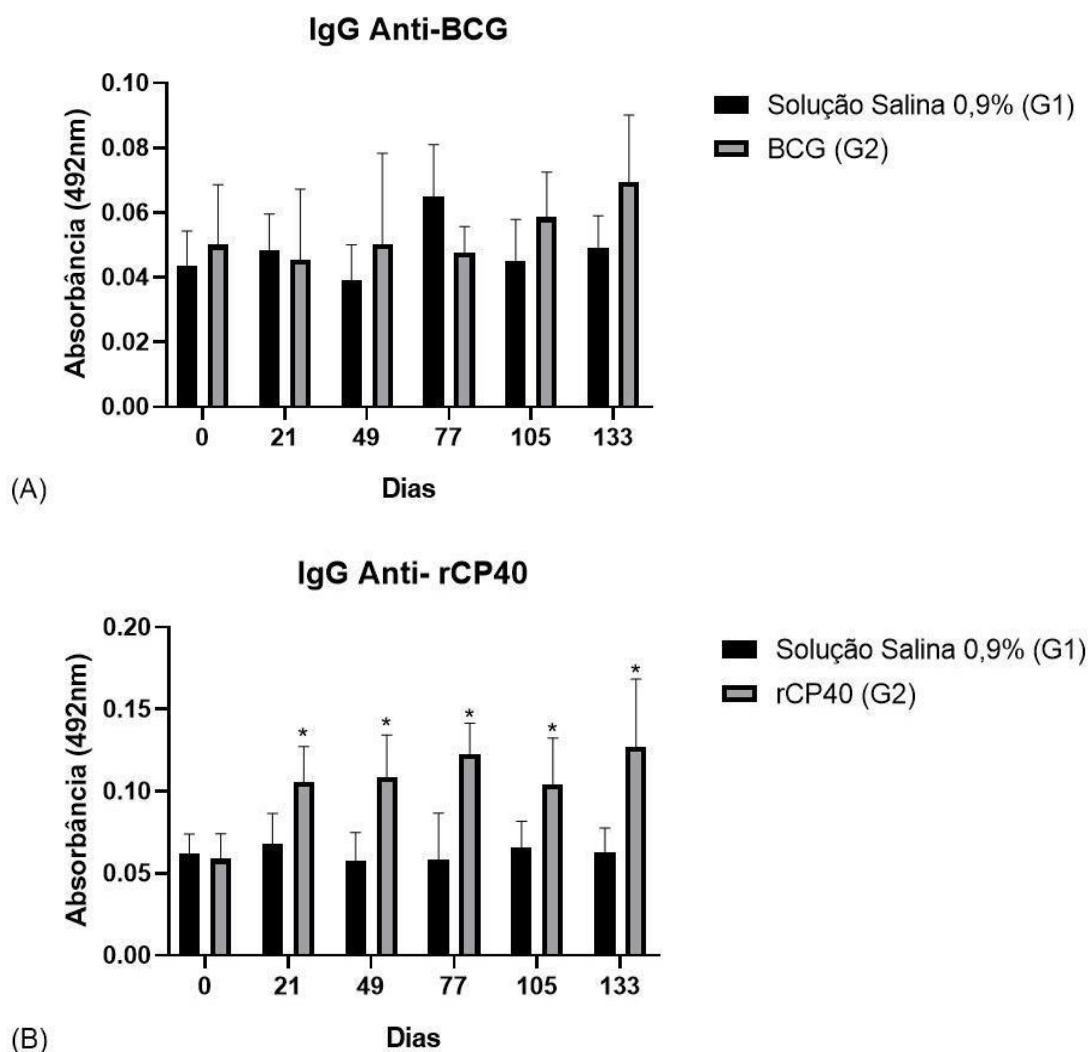
7.3. Avaliação dos níveis de IgG

No que concerne à produção de anticorpos IgG, mensurados pela realização do ELISA indireto, constatou-se que o teste onde ocorreu a sensibilização da placa com a *Mycobacterium bovis* BCG não demonstrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o grupo controle (G1) e o grupo vacinado (G2), até mesmo após o desafio, que aconteceu no dia 49 (Figura 1A). Contudo,

foi observado nos dias 49, 105 e 133 maiores níveis de IgGs Anti-BCG no grupo vacinado, determinando diferença entre G1 e G2, ainda que não significativa.

Em contrapartida, ao utilizar a proteína recombinante rCP40 na sensibilização do teste diagnóstico, observou-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos a partir do dia 21 do experimento (Figura 1B), onde ocorreu a administração da segunda dose da formulação vacinal. Essa produção de IgG Anti-rCP40 se manteve significativamente maior no grupo vacinado (G2) até o último dia do experimento.

Figura 2. Níveis de anticorpos em ovinos antes e após inoculação destes com a proteína rCP40 de *C. pseudotuberculosis* e o adjuvante *M. bovis* BCG Pasteur durante os dias de experimento. Os soros dos animais foram coletados nos dias 0, 21, 49, 77, 105 e 133 para quantificação de IgGs anti-BCG (A) e anti-rCP40 (B) a partir do ELISA indireto na absorvância de 492 nm. O “*” demonstra diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e o vacinado.



8. DISCUSSÃO

A infecção de ovinos e caprinos pela bactéria *C. pseudotuberculosis*, causadora da linfadenite caseosa, está ligada a uma perda econômica considerável em países que se utilizam desses pequenos ruminantes para sua produção. As tentativas de estabelecer uma imunoprofilaxia eficaz ainda se mostram um desafio, visto que ainda não foi observada uma proteção duradoura nos animais vacinados com formulações já existentes (Oreiby, 2015; De Pinho *et al.*, 2021).

Contudo, observou-se um padrão positivo da resposta imunológica adquirida neste estudo, em vista da produção sustentada de IgGs anti-rCP40 pela espécie-alvo que foi conferida pelo imunizante aqui desenvolvido. O uso da proteína recombinante na formulação promoveu diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos controle e vacinado no que concerne à resposta imune humoral, que foram destacadas após aplicação da segunda dose no dia 21. Ademais, a vacina produzida foi efetiva em promover esse padrão de diferença até o final do experimento, apesar da variação da concentração de IgGs ocorrida do dia 77 para o dia 105.

De modo similar, a utilização de rCP40 demonstrou resultados promissores em modelo murino, como podem ser vistos nos estudos de Silva *et al.* (2014), que desenvolveram formulações vacinais compostas pela proteína isolada, assim como também combinada com a cepa mutante CP09 de *C. pseudotuberculosis*. Os resultados mostraram uma produção significativa de IgGs ($p > 0,05$) nos grupos imunizados quando comparados aos demais, mantendo-se uma produção sustentada em relação aos níveis de IgG2a em ambos os grupos. Em contrapartida, não foi observado o mesmo em relação ao padrão de IgG1 produzido nos animais que receberam apenas a rCP40, visto que não apresentaram a mesma relevância até o final do experimento, mesmo após o desafio. Vale ressaltar que essas diferenças significativas foram observadas 15 dias após aplicação da segunda dose, o que difere dos dados obtidos na presente pesquisa.

Em adição, um estudo guiado por Droppa-Almeida *et al.*, (2016) utilizando camundongos também demonstrou o potencial imunoprotetor da proteína recombinante supracitada, quando associada aos adjuvantes completo de Freund e saponina, distinguindo-se deste trabalho no que diz respeito à linha de produção de IgGs dos grupos durante os dias de experimento. Nesse contexto, foram administradas aos animais do estudo três doses da rCP40 combinada aos adjuvantes com intervalo de duas semanas entre elas. No grupo experimental

que recebeu rCP40 e saponina, foi verificada uma diferença significativa na produção de IgG total ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle a partir do dia 60 após imunização. Já no grupo que recebeu essa proteína e o adjuvante completo de Freund, observou-se uma diferença significativamente maior de anticorpos com início no dia 30. Após o desafio com a *C. pseudotuberculosis* C57, a produção de anticorpos foi mantida, porém houve variação no padrão dessa diferença.

Ademais, a vacina proposta nesta pesquisa empregou o *M. bovis* BCG, devido às suas propriedades de imunização cruzada com *C. pseudotuberculosis*, dada sua proximidade filogenética e capacidade de estimular a resposta imune de forma a produzir IFN- γ (Pinho *et al.*, 2021). Os resultados apurados mostraram que os níveis de IgGs anti-BCG obtidos no grupo vacinado não foram significativamente maiores em relação ao grupo controle. Isso pode ser explicado pela persistência da micobactéria no interior de fagócitos, como as células apresentadoras de antígenos (APCs), sendo a imunidade humoral promovida pela BCG vista comumente com menor magnitude (Tanner *et al.*, 2019; Parmar *et al.*, 2021).

Em vista disso, pode-se notar um menor número de pesquisas referentes à sua aplicação para imunoprevenção da LC. Leal *et al.*, (2018) já havia relatado o emprego desse microrganismo, mas como vetor de expressão da proteína PLD para imunização de camundongos, que foram posteriormente desafiados com a cepa MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*, onde foi possível atingir uma taxa de sobrevivência de 77%. Outro estudo também utilizou o BCG como vacina vetorial, dessa vez expressando as proteínas CP40 e CP09720, obtendo-se uma proteção de 70% em ambos os grupos que foram vacinados a partir dessa técnica (De Pinho *et al.*, 2024).

É válido ressaltar que a utilização de adjuvantes vacinais são de extrema importância para aprimorar a resposta imunológica, podendo variar de acordo com a enfermidade a ser prevenida e o tipo de mecanismo imune necessário. No que concerne às vacinas recombinantes, a combinação destas com adjuvantes é fundamental para seu êxito, tendo em vista que a maioria dos antígenos envolvidos não possuem uma alta imunogenicidade (Shuting *et al.*, 2019).

Diante dos resultados obtidos, pode-se notar que a vacina recombinante desenvolvida foi capaz de produzir níveis significativos de anticorpos IgG anti-rCP40, enquanto não foi observada a mesma produção em relação aos IgGs anti-BCG, todavia o *M. bovis* BCG foi utilizado apenas com a finalidade de auxiliar na resposta imunológica de forma a torná-la efetiva, o que de fato ocorreu.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A formulação vacinal contendo a proteína recombinante rCP40 em associação ao *M. bovis* BCG foi capaz de produzir níveis significativos de anticorpos do tipo IgG em ovinos, que se mantiveram sustentados até o dia 133 após a primeira dose. No entanto, é necessário que alguns estudos referentes à resposta celular sejam realizados, a fim de compreender melhor a atuação dessa vacina na produção de citocinas e demais moduladores do sistema imune.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, J. F. F.; *et al.* Clinical case of caseous lymphadenitis in a goat: case management. **Malaysian Journal of Veterinary Research**, v. 8, n. 1, p. 31-35, 2017.
- BARRAL, T. D. *et al.* A panel of recombinant proteins for the serodiagnosis of caseous lymphadenitis in goats and sheep. **Microbial biotechnology**, v. 12, n. 6, p. 1313–1323, 2019.
- BARH, D. *et al.* A novel comparative genomics analysis for common drug and vaccine targets in *Corynebacterium pseudotuberculosis* and other CMN group of human pathogens: Novel genomics approach for common targets in C. pseudotuberculosis and CMN group of pathogens. **Chemical biology & drug design**, v. 78, n. 1, p. 73–84, 2011.
- BASTOS, B. L. *et al.* *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological responses in animal models and zoonotic potential. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, v. 4, n. 005, p. 10.4172, 2012.
- BASTOS, R. G. *et al.* Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. **Vaccine**, v. 27, n. 47, p. 6495–6503, 2009.
- BEZERRA, F. S. B. *et al.* The combination of Brazilian red propolis and recombinant protein rCP01850 in the immunoprophylaxis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 104354, 2020.
- BRUM, A. A. *et al.* Recombinant esterase from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit recombinant vaccines partially protects mice against challenge. **Journal of medical microbiology**, v. 66, n. 5, p. 635–642, 2017.
- NCBI. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/1719/>>.
- D'AFONSECA, V. *et al.* A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 1, p. 252–260, 2008.
- DE PINHO, R. B. *et al.* Vaccines for caseous lymphadenitis: up-to-date and forward-looking strategies. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 6, p. 2287–2296, 2021.

DE PINHO, R. B. *et al.* Mycobacterium bovis BCG expressing the proteins CP40 or CP09720 of Corynebacterium pseudotuberculosis promotes protection in mice after challenge. **Vaccine**, v. 42, n. 1, p. 33–39, 2024.

DE SÁ *et al.* Comparative Proteomic Analyses Between Biofilm-Forming and Non-biofilm-Forming Strains of Corynebacterium pseudotuberculosis Isolated From Goats. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, 2021.

DOMÍNGUEZ, M. C. R. *et al.* Linfadenitis caseosa: factores de virulencia, patogénesis y vacunas. Revisión. **Revista mexicana de ciencias pecuarias**, v. 12, n. 4, p. 1221–1249, 2021.

DOMÍNGUEZ, M. C. R. *et al.* Bioinformatic Approach of B and T Cell Epitopes of PLD and CP40 Proteins of Corynebacterium pseudotuberculosis ovis Mexican Isolate 2J-L towards a Peptide-Based Vaccine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 1, p. 270–270, 2023.

DORELLA, F. A. *et al.* Corynebacterium pseudotuberculosis: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary Research**, v. 37, n. 2, p. 201–218, 2006.

DORELLA, F. A. *et al.* Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. **Expert Review of Vaccines**, v. 8, n. 2, p. 205–213, 2009.

DROPPA-ALMEIDA, D. *et al.* Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. **Vaccine**, v. 34, n. 8, p. 1091–1096, fev. 2016.

DROPPA-ALMEIDA, D. *et al.* Immune-Informatic Analysis and Design of Peptide Vaccine From Multi-epitopes Against *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 12, p. 117793221875533, 2018.

DROPPA-ALMEIDA, D. *et al.* Peptide vaccines designed with the aid of immunoinformatic against Caseous Lymphadenitis promotes humoral and cellular response induction in mice. **PLOS ONE**, v. 16, n. 11, p. e0256864–e0256864, 2021.

ESHRA, M. *et al.* A trial for vaccination of sheep against caseous lymphadenitis using oil adjuvant bacterin enhanced by Bacillus calmette-Guerin vaccine. **Alexandria journal of veterinary sciences**, v. 59, n. 1, p. 140, 2018.

Expasy ProtParam tool. Expasy.org. Disponível em: <<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>>.

FONTAINE, M. C. *et al.* Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine**, v. 24, n. 33-34, p. 5986–5996, 2006.

GARBE, J.; COLLIN, M. Bacterial hydrolysis of host glycoproteins - powerful protein modification and efficient nutrient acquisition. **Journal of innate immunity**, v. 4, n. 2, p. 121–131, 2012.

GASCOIGNE, E. *et al.* Update on caseous lymphadenitis in sheep. **In Practice**, v. 42, n. 2, p. 105–114, 2020.

GONZÁLEZ-SÁNCHEZ *et al.* Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* with the recombinant rHc23. **Effect of adjuvant and antigen dose**. Plos ONE. 13 (3): e0193118, 2018.

GUEDES, M. T. *et al.* Infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em equinos: aspectos microbiológicos, clínicos e preventivos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 8, p. 701–708, ago. 2015.

GUIMARÃES, A. S. *et al.* Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. **IIOAB J**, v. 2, n. 11, 2011.

KALIL FILHO, J. E. *et al.* Novas estratégias de vacinas. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, n. 1, p. 65-71, 2008.

LEAL, K. S. *et al.* Recombinant *M. bovis* BCG expressing the PLD protein promotes survival in mice challenged with a *C. pseudotuberculosis* virulent strain. **Vaccine**, v. 36, n. 25, p. 3578–3583, 2018.

FACCIOLI-MARTINS, P. Y. *et al.* Linfadenite caseosa: perspectivas no diagnóstico, tratamento e controle. - **Portal Embrapa**. Sobral : Embrapa Caprinos e Ovinos, 2014. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1007402/linfadenite-caseosa-perspectivas-no-diagnostico-tratamento-e-controle>>. Acesso em: 12 nov. 2022.

DE OLIVEIRA, E. L. Linfadenite caseosa. - **Portal Embrapa**. Sobral : Embrapa Caprinos e

Ovinos, 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1028090/linfadenite-caseosa>>.

MEYER, R. *et al.* Evaluation of humoral immune response in goats inoculated with a live attenuated lyophilized vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 42-48, 2002.

MOTTA, R. G. *et al.* Infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em animais de produção. **Veterinária e Zootecnia**, v. 17, n. 2, p. 200-213, 2010.

NORMAN, T. E. *et al.* In vitro susceptibility of equine-obtained isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* to gallium maltolate and 20 other antimicrobial agents. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2684-2685, 2014.

OLIVEIRA, A. *et al.* *Corynebacterium pseudotuberculosis* may be under anagenesis and biovar Equi forms biovar Ovis: a phylogenic inference from sequence and structural analysis. **BMC microbiology**, v. 16, n. 1, p. 1-11, 2016.

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

OSMAN, A. *et al.* The Epidemiology and Pathophysiology of Caseous Lymphadenitis: A Review. **J Vet Med Res**, v. 5, n. 3, p. 1129, 2018.

PARISE, D. *et al.* The transcriptional regulatory network of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, p. 415, 2021.

PARMAR, K.; SIDDIQUI, A.; NUGENT, K. Bacillus Calmette-Guerin vaccine and nonspecific immunity. **The American journal of the medical sciences**, v. 361, n. 6, p. 683-689, 2021.

PINHO, J. M. 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. **The open veterinary science journal**, v. 3, n. 1, p. 22–27, 2009.

REZENDE, A. F. S. *et al.* In silico identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigenic targets and application in immunodiagnosis. **Journal of medical microbiology**, v. 65, n. 6, p. 521–529, 2016.

REZENDE, A. F. S. *et al.* Assessment of the acid phosphatase CP01850 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit vaccine formulations against caseous lymphadenitis. **Arquivo brasileiro de medicina veterinaria e zootecnia**, v. 72, n. 1, p. 199–207, 2020.

RODRIGUES, R. R. *et al.* Evaluation of the expression and immunogenicity of four versions of recombinant *Clostridium perfringens* beta toxin designed by bioinformatics tools. **Anaerobe**. v. 69, p. 102326, 2021.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J.; CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, D. M. **Bacteria: Mycobacterium bovis**. Reference Module in Food Science, 2019.

RUDD, P. M. *et al.* Glycosylation and the immune system. **Science (New York, N.Y.)**, v. 291, n. 5512, p. 2370–2376, 2001.

SANTOS, E. M. S. *et al.* Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* with promising potential for caseous lymphadenitis vaccine development: a literature review. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 2, p. 90-99, 2016.

SELIM, S. A. *et al.* Vaccinal Efficacy of Genetically Inactivated Phospholipase D Against Caseous Lymphadenitis in Small Ruminants. **International Journal of Microbiological Research**, v. 1, n. 3, p. 129-136, 2010.

SHADNEZHAD; NAEGELI; COLLIN. CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* is an endo- β -N-acetylglucosaminidase. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2016.

SHUTING, S. *et al.* Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. **Vaccine**, v. 37, n. 24, p. 3167–3178, 2019.

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. 1-8, 2014.

SILVA, M. T. O. *et al.* Association of *Corynebacterium pseudotuberculosis* recombinant proteins rCP09720 or rCP01850 with rPLD as immunogens in caseous lymphadenitis immunoprophylaxis. **Vaccine**, v. 36, n. 1, p. 74–83, 2018.

SUNITA *et al.* Computational tools for modern vaccine development. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v. 16, n. 3, p. 723–735, 2019.

TANNER, R.; VILLARREAL-RAMOS, B. *et al.* The Humoral Immune Response to BCG Vaccination. **Frontiers in immunology**, v. 10, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6579862/>>.

UniProt. Uniprot.org. Disponível em: <<https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A1J0KIS5/entry#structure>>.

WALKER, J. *et al.* Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 6, p. 2562–2567, 199

