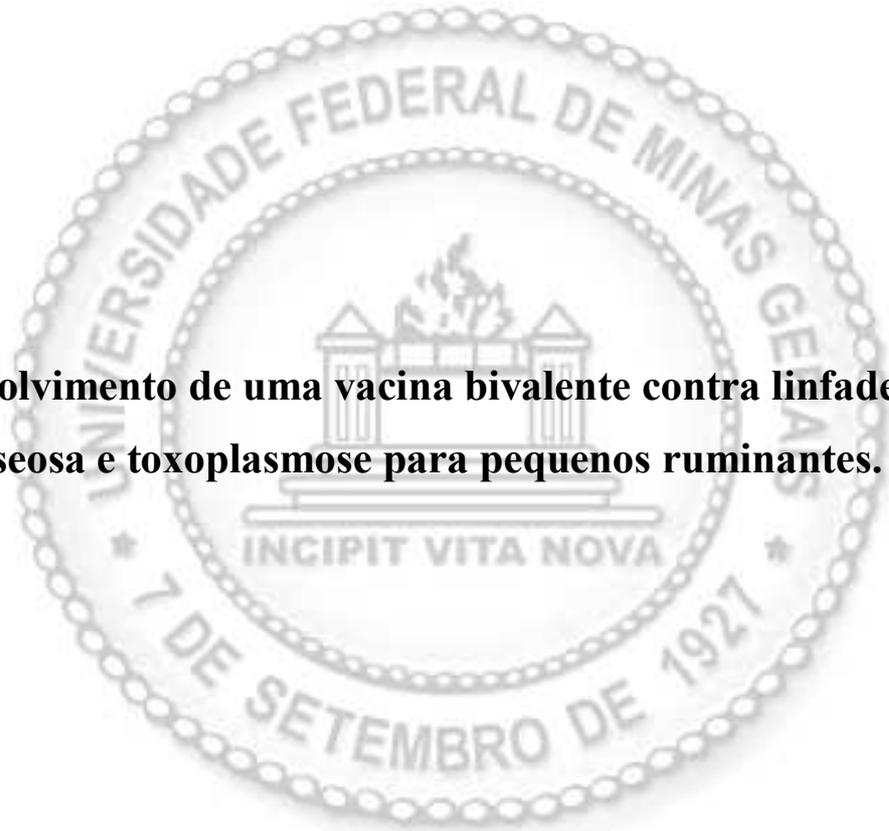


**DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO**

**Desenvolvimento de uma vacina bivalente contra linfadenite
caseosa e toxoplasmose para pequenos ruminantes.**



ORIENTADA: Flávia de Souza Rocha

ORIENTADOR: PROF. DR. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

COORIENTADOR: Dr. Thiago Luiz de Paula Castro

Flávia de Souza Rocha

Desenvolvimento de uma vacina bivalente contra linfadenite caseosa e toxoplasmose para pequenos ruminantes.

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre pelo programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

ORIENTADOR: PROF. DR. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

COORIENTADOR: Dr. Thiago Luiz de Paula Castro

BELO HORIZONTE

2016

043 Rocha, Flávia de Souza.
Desenvolvimento de uma vacina bivalente contra linfadenite caseosa e toxoplasmose para pequenos ruminantes [manuscrito] / Flávia de Souza Rocha. - 2016.
81 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo. Coorientador: Dr. Thiago Luiz de Paula Castro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 3. Linfadenite. 4. *Toxoplasma*. 5. Vacinas. 6. Biotecnologia. 7. Toxoplasmose. I. Azevedo, Vasco Ariston de Carvalho. II. Castro, Thiago Luiz de Paula. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Desenvolvimento de uma vacina bivalente contra linfadenite caseosa e toxoplasmose para pequenos ruminantes"

Flávia de Souza Rocha

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo - Orientador
UFMG

Dr. Thiago Luiz de Paula Castro - Coorientador
UFMG

Dr. Anderson Miyoshi
UFMG

Dr. Henrique César Pereira Figueiredo
UFMG

Data da defesa: 29/01/2016

Frederico Marianetti Soriani
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Genética



Documento assinado eletronicamente por **Frederico Marianetti Soriani, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 05/08/2021, às 09:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0874759** e o código CRC **670A6AB2**.

“De quando em quando, é importante perguntar a ti mesmo até que ponto o progresso exterior que usufruís te concede a paz de que necessitas.”

*(Ismael Gomes Braga, psicografia de **Chico Xavier**)*

“Depois de algum tempo, você aprende”...

Que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser;

Que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é

curto; Aprende que não importa aonde já chegou, mas onde está indo;

E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir

muito mais longe depois de pensar que não se

pode mais.

E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!”

*(**William Shakespeare**)*

Agradecimento

A Deus pela vida, saúde, paz, proteção e influências salutares sempre;

Aos meus pais Jane e Marcos pelo carinho, dedicação e educação que me tornou uma pessoa de bem;

Aos meus irmãos, Fabiana e Marcos, e meus sobrinhos Daniel e Ian Marcos, meus maiores impulsionadores;

A toda minha família que sempre estiveram ao meu lado me apoiando de todas as formas que eu precisei e torcem pela minha felicidade;

A minha amiga irmã desde a infância Aline, muito obrigada por tudo;

Aos meus grandes amigos e amigas, Aracele, Bruno, Roselane, Marcília, Fernanda Magalhães, Tayline, Edgar, Carlos, Fillipe, Sheila, que me apoiaram em todos os momentos, sempre proferiram palavras de apoio e torceram pela minha felicidade e suas contribuições foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Geraldo por todo apoio e companheirismo;

Ao Prof. Dr. Vasco Azevedo pela oportunidade e incentivo desde o início da graduação;

Ao Prof. Dr. Anderson Miyoshi por todo o conhecimento passado e pelo precioso auxílio sempre que eu precisei durante esses oito anos de convivência;

À Dr. Fernanda Dorella pelo treinamento e orientação, pelas discussões e sugestões valiosas e pela sincera atenção com que sempre me recebera;

A Profa. Dra. Ana Lúcia Bruniald por todo apoio e compreensão;

Aos orientadores e membros da banca pela importante contribuição para o desenvolvimento e a melhoria deste trabalho;

A Coordenação, professores e às secretárias da PG Genética, Mary e Enaile pela paciência e esclarecimentos prestados;

Aos colaboradores, que foram fundamentais para a realização deste trabalho: Prof. Dr. Ricardo Wagner, Prof. Dr. Oscar Bruña-Romero e a doutoranda Mara Camila;

Aos colegas do LGCM por todos esses anos de convivência, em especial: Marcela, Thiago Souza, Priscilla, Leandro, Mariana Santana, Alberto, Sandeep, Flávia, Rodrigo, Hassan, Jamal;

Aos colegas que conheci no LGCM e hoje já estão atuando em outras instituições: Diego, Leticia, Siomar, Luis Guimarães, Wanderson, Vanessa Bastos, Camila Azevedo, Camila Prospero, Pablo, Fernanda Lima, Dayana;

Aos demais colegas do ICB, em especial a Sheila, Zé Carlos, Selma, Marlene e Marina, obrigada por todo incentivo e torcida;

Às agências de fomento: FAPEMIG, CNPq, CAPES, FUMP;

Enfim a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho, muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMO	12
ABSTRACT	13
I. INTRODUÇÃO.....	14
I.1 Ovinocaprinocultura no Brasil.....	14
I.2 Linfadenite caseosa.....	15
I.2.1 Agente etiológico da Linfadenite caseosa – <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	15
I.2.2. Transmissão e Imunopatogênese da Linfadenite caseosa	16
I.2.3. Tratamento e profilaxia da Linfadenite caseosa	18
I.2.4. Vacinas contra a Linfadenite caseosa	18
I.3. Toxoplasmose.....	25
I.3.1 Toxoplasmose em caprinos e ovinos	25
I.3.2 <i>Toxoplasma gondii</i> , o agente etiológico.....	26
I.3.3 Transmissão da toxoplasmose	27
I.3.4 Imunopatogênese da toxoplasmose.....	27
I.3.5. Tratamento e profilaxia contra a toxoplasmose em pequenos ruminantes.....	29
I.3.6 Vacinas contra toxoplasmose caprina e ovina.....	29
I.5. Justificativa.....	34
II. OBJETIVOS	36
II.1 Objetivo Geral.....	36
II. 2 Objetivos específicos.....	36
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
III.1. Soluções e meio de cultura.....	37
III.2 Material biológico	39
III.2.1 Linhagens, plasmídeos e condições de cultivo.	39
III.2.2 Confeção dos oligonucleotídeos.....	40
III.2.3 Animais e parâmetros da infecção.....	41
III.3 Subclonagem em vetor de replicação <i>Zero Blunt</i>®.....	41
III.3.1 Amplificação da ORF SAG2 em vetor de expressão	41

III.3.2	Preparação das células eletrocompetentes da linhagem <i>Escherichia coli</i> TOP10®	42
III.3.3	Eletrotransformação em <i>Escherichia coli</i> TOP10®	43
III.3.4	Confirmação da subclonagem <i>Escherichia coli</i> TOP10®	44
III.4	Clonagens nos plasmídeos de expressão pCXS35, pCXI40 e pCXI45	45
III.4.1	Preparação das células eletrocompetente da linhagem <i>C. pseudotuberculosis</i> CP13	47
III.4.2	Eletrotransformação na linhagem <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> CP13	47
III.4.3	Confirmação da clonagem <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> CP13	48
III.5	Análise da expressão de proteína recombinante SAG2 por <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> CP13	49
III.5.1	Cinética da expressão da proteína	49
III.5.2	Extração da proteína	50
III.5.3	Resolução eletroforética das proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante SDS-PAGE	51
III.6	Teste de virulência e persistência das linhagens recombinantes em modelo murino	51
IV.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
IV.1	Clonagem da ORF SAG2 nos plasmídeos de expressão	53
IV.1.1	Amplificação da ORF SAG2	53
IV.1.2	Clonagem e confirmação das clonagem da ORF SAG2 no vetor <i>Zero Blunt</i> ®	54
IV.1.3	Clonagem e confirmação das clonagem da ORF SAG2 nos vetores de expressão	56
IV.4	Obtenção das linhagens <i>C. pseudotuberculosis</i> CP13 carreando os diferentes vetores de expressão	61
IV.5	Análise da expressão da proteína recombinante SAG2 por <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> CP13	63
IV.6	Avaliação da virulência e persistência das linhagens recombinantes <i>C. pseudotuberculosis</i> CP13	67
V.	CONCLUSÃO	71
VI.	PERSPECTIVAS	72
REFERÊNCIAS	73

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação esquemática do vetor Zero Blunt[®], destacando-se o sítio de clonagem múltipla do mesmo. 433
- Figura 2** - Diagrama esquemático de vectores de expressão: pCXS35, pCXI40 e pCXI45 contendo os promotores, P_{SOD} com uma SD conservada; P_{ilvC} e P_{ilvC} com uma conservada SD-2, respectivamente. Adaptado de LEE, 2014..... 466
- Figura 3** – Análise do produto de amplificação da ORF SAG2 para clonagem nos plasmídeos pCXS35, pCXI40 e pCXI45 a partir do plasmídeo pECTACK99-PS-SAG2. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio.. 544
- Figura 4** - Amplificação por PCR da ORF SAG2 recombinante de *T. gondii* e digestão enzimática a partir do DNA plasmidiano extraído de células de *E. coli* TOP10 transformadas com o plasmídeo pZB:SAG2.55
- Figura 5** - Representação esquemática do vetor de expressão pCXS35:SAG2.57
- Figura 6**- Representação esquemática do vetor de expressão pCXI40:SAG2.57
- Figura 7** - Representação esquemática do vetor de expressão pCXI45:SAG2.58
- Figura 8** – Amplificação através da técnica de PCR da ORF SAG2 recombinante de *T. gondii* dos DNAs plasmidiano extraídos de *E. coli* TOP10 transformadas com os plasmídeos pCXS35:SAG2, pCXI40:SAG2 e pCXI45:SAG2. 59
- Figura 9** – Digestão enzimática dos DNAs plasmidiano extraídos de *E. coli* TOP10 transformadas com os plasmídeos pCXS35:SAG2 e pCXI40:SAG2 e pCXI45:SAG2.600
- Figura 10** – Amplificação por PCR e Digestão enzimática dos DNAs plasmidiano extraídos de *C. pseudotuberculosis* CP13 transformadas com os plasmídeos pCXS35:SAG2, pCXI40:SAG2 e pCXI45:SAG2..... 6262
- Figura 11** – SDS-PAGE realizado a partir do extrato total das proteínas citoplasmático de cultura bacteriana da linhagem *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXS35:SAG2.....63
- Figura 12** - SDS-PAGE realizado a partir do extrato total das proteínas secretadas de cultura bacteriana da linhagem *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXS35:SAG2.....64
- Figura 13** - SDS-PAGE realizado a partir do extrato total das proteínas citoplasmáticas de cultura bacteriana da linhagem *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXI40:SAG2.....65
- Figura 14** - SDS-PAGE realizado a partir do extrato total das proteínas secretadas de cultura bacteriana da linhagem *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXI45:SAG2.....65
- Figura15** - Unidades formadoras de colônia presentes no baço dos camundongos BALB/c nos dias 3, 7 e 10 após a infecção com as respectivas linhagens.....68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Microrganismos utilizados neste trabalho.....	39
Tabela 2 - Plasmídeos utilizados neste trabalho.....	40
Tabela 3 - Iniciadores para ORF SAG2.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

aa – Aminoácidos

APC - Células Apresentadoras de Antígenos

BAG - Antígeno de bradizoíto

BHI - “*Brain Heart Infusion*”

Ca²⁺ - Íon cálcio

cDNA - DNA complementar

CFA - Adjuvante Completo de Freund

Cm - Clorafenicol

CMNR – *Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia e Rhodococcus*

DC - Células Dendríticas

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP - Desoxinucleotídeo trifosfato

DTT - ditioneitol

EDTA - Etileno diamino tetra-acetato dissódio

ELISA - Ensaio imunoenzimático

GFP – “*Green fluorescent protein*”

GPI - Glicosilfosfatidilinositol

GRA - Grânulos densos

HCl - Ácido clorídrico

IFN- γ - Interferon gama

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL - Interleucina

IPTG - Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

ISCOMS - Associados a Complexos Imunoestimuladores

Kb - Quilobases (10^3 pb)

KCl - Cloreto de potássio

KDa - Quilodaltons (10^3 Da)

Km - Canamicina

L - Litro

LB - Luria-Bertani
LC - Linfadenite Caseosa
LD - Dose letal
LPS - Lipopolissacáridos
M - Molar
mA - Miliampere (Amperagem)
MAG1- Antígeno da matriz
MCS - Múltiplo sítio de clonagens
Mg²⁺ - Íon magnésio
MgCl₂ - Cloreto de magnésio
MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIC - Micronemas
mL - Mililitro
mM - Milimolar
mRNA - RNA mensageiro
NaCl - Cloreto de sódio
NaOH - Hidróxido de sódio
ng - Nanogramas
NICE - “*Nisin Controlled Expression System*”
NK - “*Natural Killer*”
OMS – Organização Mundial de Saúde
ORF – “*Open Read Frame*”
pb - Pares de base
PBS - “*Phosphate Buffered Saline*”
pCMV - Promotor do citomegalovírus
PCR - “*Polymerase Chain Reaction*”
PHOP - Proteína citoplasmática reguladora de resposta celular
PHOQ - Proteína transmembrânica histidina kinase
Pi - Fosfato inorgânico
PLD - Fosfolipase D
PSA - Persulfato de Amônio
q.s.p. - Quantidade Suficiente para
qRT-PCR - Transcriptase Reversa PCR quantitativa
rAd/SAG2 - Adenovírus expressando SAG2.

rFLU/SAG2 - Vetores virais recombinante de Influenza A expressando SAG2

RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

RNA - Ácido ribonucléico

Rnase - Ribonuclease A

ROP - Róptrias

rpm - Rotações por Minuto

rRNA - RNA ribossômico

RT-PCR - Transcriptase Reversa PCR

SAG - Antígeno de superfície

SD - *Shine-Dalgarno*

SDS - Sodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - "*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*"

SRSs - Sequências relacionadas à SAG

TCA - Ácido tricloroacético

TCR - Receptor de Célula T

TE-LYS - Tris-EDTA-Lisozima

TLA - Antígeno total lizado

TMB - 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina

TnFuZ - Transposon

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

Tris - Tris-hidroximetilaminometano

T_{rrnB} - Terminador transcricional rrnB

u.f.c. - unidade formadora de colônia

u.f.c. - Unidade formadora de colônia

u.f.p - Unidade formadora de placas

V - Volts

W - Wats

Ω - Ohm (resistência)

RESUMO

A ovinocaprinocultura no Brasil tem criado novas possibilidades comerciais e se tornado bastante expressiva por meio da implantação de explorações de criações extensivas. Apesar do desenvolvimento de novas tecnologias e modelos de sistemas de produção, a indústria de caprinos e ovinos tem sido afetada pela ocorrência de doenças infecciosas, entre as quais se destacam a linfadenite caseosa (LC) e a toxoplasmose - cujos agentes etiológicos são *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Toxoplasma gondii*, respectivamente. Ambas as doenças são mundialmente distribuídas e apresentam altos índices de prevalência, sendo a toxoplasmose a zoonose mais disseminada no mundo. A vacinação seria a estratégia mais adequada para o controle e erradicação de doenças infectocontagiosas crônicas e intensas pesquisas tem sido realizadas nesse sentido. Nesse contexto, o objetivo foi modificar a linhagem vacinal CP13 de modo a torná-la um veículo para a entrega do antígeno imunodominante rSAG2 (Antígeno de superfície) de *T. Gondii*, cujo papel protetor contra toxoplasmose tem sido demonstrado por diferentes grupos de pesquisa. Utilizando diferentes plasmídeos de expressão heteróloga em corinebactérias, obteve-se três diferentes linhagens derivadas de CP13 com o intuito de expressar o antígeno rSAG2. Os níveis de expressão da proteína heteróloga pela linhagem CP13 não foram detectados por SDS-PAGE, sendo necessária mais investigação. No ensaio de infecção em modelo murino foi observado a redução da virulência e persistência das construções obtidas nesse trabalho, indicando a incapacidade de desenvolver a patologia. Desse modo, essa proposta viabiliza a perspectiva de criar uma vacina bivalente contra LC e toxoplasmose.

ABSTRACT

The sheep and goat farming in Brazil has created new business opportunities and become quite significant through implementation of extensive creation farms. Despite the development of new technologies and models of production systems, the sheep and goat industry has been affected by improper handling and by the occurrence of infectious diseases, among which stand out caseous lymphadenitis (LC) and toxoplasmosis - etiological agents *Corynebacterium pseudotuberculosis* and *Toxoplasma gondii*, respectively. Both diseases are spread worldwide, and have high prevalence rates, toxoplasmosis being the most widespread type zoonotic disease in the world. Vaccination would be the most appropriate strategy to control and even to eradicate chronic infectious diseases and intensive research has been conducted in this regard. Recently, our research group has shown that a live attenuated vaccine based on CP13 strain of *C. pseudotuberculosis* (deficient to acquire iron) gives mice 80% protection after challenge with virulent strain. In this context, our goal is to change the vaccine strain CP13 in order to make it a vehicle for the delivery of the immunodominant antigen of *T. gondii* SAG2 (*Surface Antigens*), whose protective role against toxoplasmosis has been shown by different research groups. Accordingly, this proposal allows for the view to create a bivalent vaccine against toxoplasmosis LC and a low production cost and possibility of a single dose administration. By using different plasmids heterologous expression in corynebacteria, we were able to obtain three different lines derived from that produced CP13 antigen rSAG2 constitutively or induced by IPTG. The expression levels of the heterologous protein by CP13 strain were evaluated by SDS-PAGE, however low levels of the translated protein was detected in the strain transformed with the recombinant plasmid constitutive promoter, thereby requiring further investigation. The study of infection with recombinant strains in murine model was accomplished and as a result, we observed reduction in virulence and persistence of all lineages. The data obtained to corroborate the use of these strains as live attenuated vaccine. This study is a first step towards in development of a live attenuated vaccine coupled to an array of heterologous protein expression.

I. INTRODUÇÃO

I.1 Ovinocaprinocultura no Brasil

No Brasil, o agronegócio é a base da economia nacional, no ano de 2008 e alcançou o terceiro lugar no *ranking* mundial de exportação de produtos agrícolas. Nesse mesmo ano, o Brasil exportou cerca de US\$ 61,4 bilhões em produtos agropecuários e possui potencial não só para se tornar o maior fornecedor de proteína de origem animal como também de origem vegetal, em escala global (OMS, 2010). Além disso, é um dos poucos países do mundo que pode ampliar a produção de alimentos com ganhos reais de produtividade, mantendo suas reservas naturais a salvo (MAPA, 2012).

A caprinocultura e a ovinocultura tem aumentado, consideravelmente, suas participações no agronegócio brasileiro e a tendência é de que se mantenham em expansão. Vários fatores nos cenários nacional e internacional mostram essa vertente, como exemplo disto pode-se destacar: a mudança de atitude da população no que se refere à alimentação e também às estratégias de conquistas de mercado (MAPA, 2014), que estimulam ao aumento do consumo de produtos oriundos da ovinocaprinocultura.

O rebanho brasileiro de criação de caprinos está estimado em 14 milhões de animais, distribuído em 436 mil estabelecimentos agropecuários. Estes estão localizados, na sua maior parte, no Nordeste, com destaque para os estados da Bahia, Pernambuco, Piauí e Ceará (IBGE, 2012)¹. Esses dados coloca o Brasil em 18º lugar no *ranking* mundial de exportações, estando a carne, a pele e o leite entre os principais produtos exportados (SEBRAE, 2012). O leite de cabra garante destaque, pois são consumidos cerca de 21 milhões de litros leite (MAPA, 2014) e, no mercado internacional, o queijo de cabra é muito utilizado em alguns países da Europa. No que se refere à pele, há muito que se melhorar em relação à qualidade, para que se alcance o padrão de exportação exigido.

A ovinocultura tem forte representatividade na região Nordeste e no estado do Rio Grande do Sul, destacando-se a carne, a pele e a lã entre os principais produtos. A produção anual alcança 11 milhões de toneladas de lã, principalmente no Rio Grande do Sul, com cadeia produtiva formada por 35 mil estabelecimentos agropecuários. A

¹ <http://www.ibge.gov.br>

ovinocultura leiteira no país apresenta potencial para a produção de queijos finos os quais são muito valorizados no mercado internacional (MAPA, 2014).

Neste contexto, a necessidade de investimentos biotecnológicos é determinante para o desenvolvimento da ovinocaprinocultura no Brasil. Uma das áreas da biotecnologia que se investe assiduamente é a da elaboração de vacinas, que é de grande importância na prevenção de doenças infecciosas. Na ovinocaprinocultura, doenças causadas por vírus, bactérias e protozoários se dispersam nas populações de pequenos ruminantes. Algumas doenças infecciosas como brucelose, neosporose, clamidofilose, leptospirose, toxoplasmose, linfadenite caseosa, apresentam altos índices de prevalência, que podem causar prejuízos significativos para os produtores. Dentre essas, destacamos a linfadenite caseosa (LC) e a toxoplasmose, que são doenças infectocontagiosas crônicas, mundialmente distribuídas nos rebanhos de pequenos ruminantes.

I.2 Linfadenite caseosa

A LC foi descrita pela primeira vez na Austrália, em 1934, por Churchward, como uma doença infectocontagiosa crônica e recorrente que acomete populações de pequenos ruminantes em todo o mundo (COLLETT et al., 1994 *apud* COSTA, 2011).

Diante do cenário mundial, da alta incidência da LC nos rebanhos que se destaca na pecuária, tem despertado o interesse de vários grupos de pesquisa em todo o mundo. O Brasil vem expondo altos índices de prevalência da LC, principalmente na região Nordeste, onde se concentra a maior parte dos rebanhos de caprinos no país. A prevalência clínica da LC é de 30% nos rebanhos de pequenos ruminantes (RIBEIRO et al., 2001). No entanto, há relatos de que a sorologia positiva para *C. pseudotuberculosis* prevalece em até 80% nos criadouros de pequenos ruminantes do Sudeste brasileiro (GUIMARÃES et al., 2009; SEYFFERT et al., 2010).

I.2.1 Agente etiológico da Linfadenite caseosa – *Corynebacterium pseudotuberculosis*

O agente etiológico da LC é a *Corynebacterium pseudotuberculosis* que é uma bactéria Gram-positiva, que apresenta células pleomórficas, não possui cápsula, não esporula, é imóvel, possui fimbrias e é um parasita intracelular facultativo (DORELLA et al., 2009).

O gênero *Corynebacterium* é um grupo bastante heterogêneo, composto de espécies com grande variedade de nichos ecológicos. Esse gênero pertence à família dos Actinomicetos, entre os quais estão os membros do grupo CMNR, constituído pelos gêneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* que apresentam grande importância médica e veterinária. São microrganismos que apresentam algumas características muito particulares, como: (i) presença de peptidoglicanos, arabinogalactano e ácidos micólicos na composição da parede celular e (ii) alto conteúdo G+C no genoma (47-74%) (DORELLA et al., 2009).

Embora a *C. pseudotuberculosis* tenha sido isolada, primeiramente, em pequenos ruminantes, pode acometer uma enorme gama de mamíferos. Existem relatos de infecções em equinos, bovinos, suínos, camelídeos como também em humanos, sendo que nestes, os números aumentaram progressivamente (DORELLA, 2009; TROST et al., 2010).

I.2.2. Transmissão e Imunopatogênese da Linfadenite caseosa

A transmissão da doença entre os animais ocorre principalmente por meio de contato direto com ferimentos superficiais na pele, os quais podem ser causados tanto por procedimentos de manejo, tais como tosquia, castração, tratamento do cordão umbilical e a utilização de materiais contaminados, quanto por fatores naturais, como, por exemplo, em lesões provocadas por arbustos pontiagudos (ALVES & PINHEIRO, 1997). Além disso, a disseminação do patógeno pode ocorrer por meio de contaminação da água, do solo e dos alimentos, pois a bactéria é capaz de sobreviver por até seis meses no solo (BAIRD & FONTAINE, 2007).

A manifestação clínica desta patologia pode ocorrer, principalmente, de duas formas: a LC externa e a LC visceral (ou interna). Tipicamente, a doença se desenvolve de forma lenta, sendo que a forma mais frequente é a LC externa, cuja principal característica é a formação de abscessos nos nódulos linfáticos superficiais e em tecidos subcutâneos. Esses abscessos também podem se desenvolver em órgãos internos, como pulmões, rins, fígado e baço, caracterizando a LC visceral (PIONTKOWSKI & SHIVVERS, 1998). No entanto, na maioria dos casos, a infecção produz poucos sinais clínicos no animal, o que leva à impossibilidade de identificá-los até seu abate ou morte, tornando difícil o controle e também a obtenção de dados

fidedignos sobre a prevalência dessa doença nos estudos epidemiológicos (PATON et al., 1994, ARSENAULT et al., 2003).

O início da infecção ocorre após a entrada da *C. pseudotuberculosis* no hospedeiro, principalmente através de ferimentos na pele. A bactéria é, então, carregada ao linfonodo drenante local, no interior de células fagocíticas, ocorrendo um curto período de inflamação. Nesse período, a bactéria é capaz de resistir, replicar no interior dos macrófagos e em seguida escapar do compartimento fagolisossomal, em consequência da lise celular, sendo capaz de infectar outros macrófagos. Na tentativa de eliminar o microrganismo, ocorre a formação de lesões, contendo aglomerados de bactérias e células do sistema imune, ou seja, a formação de granulomas. (PAULE, 2003). Pepin e cols. (1994) observaram maior quantidade de linfócitos T CD8⁺ em granulomas formados no sítio de inoculação quando comparados com aqueles presentes em linfonodos drenantes. Essa subpopulação está relacionada com a atividade efetora/citotóxica destas células, que podem atuar como supressoras e, ainda, aumentar com o amadurecimento da lesão em relação a outras subpopulações de linfócitos, como os CD4⁺. Estudos realizados durante uma infecção experimental em ovinos possibilitaram a elucidação do perfil de citocinas expressas no granuloma (PEPIN et al. 1994). Diversas citocinas são expressas durante a infecção, entre as quais se destaca a produção de interleucina 2 (IL-2) e interleucina 4 (IL-4) em linfonodos drenantes e de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ) no sítio de inoculação, esta última de grande importância para a ativação de macrófagos os quais são os responsáveis pela eliminação de patógenos intracelulares (HODGSON et al., 1990, PEPIN et al., 1997).

Na evolução da doença para a fase crônica, os granulomas, são substituídos por necrose caseosa que é a característica predominante da LC (WINDSOR, 2011). A necrose caseosa é o abscesso contendo uma área central necrosada, que vai sendo circundados por células epiteliais, linfócitos e por uma camada de tecido conjuntivo fibroso. À medida que a lesão progride, estas camadas celulares e fibróticas vão sofrendo necrose (JONES et al., 2000). A persistência e o progresso da infecção consistem na contínua fagocitose, multiplicação intracelular do microrganismo e degeneração celular, resultando assim, no aumento do abscesso (RIBEIRO, 2013).

O papel da resposta imune humoral na proteção contra *C. pseudotuberculosis* também foi comprovada em ensaios de imunização primária com uma linhagem virulenta de *C. pseudotuberculosis* em caprinos (PAULE et al., 2003). Entretanto, uma

forte resposta imune humoral, isoladamente, não é capaz de eliminar a infecção por *C. pseudotuberculosis* (ALVES et al.,1997). Corroborando com IRWIN & KNIGHT (1975) que ressaltaram a importância da imunidade mediada por células na proteção contra *C. pseudotuberculosis*, a qual está associada à diminuição da resposta imune humoral.

I.2.3. Tratamento e profilaxia da Linfadenite caseosa

Atualmente não existem métodos de tratamento realmente eficientes contra a LC. Uma opção de tratamento é a drenagem dos linfonodos superficiais. Contudo, esta alternativa possui falhas relevantes, pois a drenagem não elimina 100% das bactérias e não é viável quando os linfonodos e os órgãos internos estão acometidos (ALVES et al., 1997). Outra opção é a antibioticoterapia que possuem ineficiência da ação do fármaco devido a dificuldade de penetração nas cápsulas dos abscessos, além do alto custo do ponto de vista econômico (DORELLA, 2009).

A inviabilidade dos tratamentos existentes reforça a importância profilática para o controle da LC. Algumas ações profiláticas são realizadas pelos produtores, dentre as quais: a higienização das instalações, as inspeções periódicas do rebanho e o isolamento dos animais doentes (WILLIAMSON, 2001; DORELLA et al., 2006a). No entanto, a vacinação seria a estratégia mais adequada para o controle e, até mesmo, para a erradicação de doenças infectocontagiosas crônicas. Diante deste cenário, diferentes estratégias vacinais já vêm sendo testadas com o intuito de combater a infecção por *C. pseudotuberculosis*. Existem algumas vacinas disponíveis no mercado nacional e internacional, no entanto, apresentam aspectos relevantes a ser considerados sobre esquema vacinal adotado e sua real eficácia.

I.2.4. Vacinas contra a Linfadenite caseosa

As vacinas representam uma estratégia de intervenção com a melhor relação custo-benefício até hoje aplicada em saúde pública. Vários grupos de pesquisas buscam incessantemente desenvolver uma vacina eficaz contra a linfadenite caseosa. Esses trabalhos realizados se referem à identificação dos fatores de virulência como também de genes que estejam relacionados à patogenicidade de *C. pseudotuberculosis*. (DORELLA, 2009; COSTA, 2011).

I.2.4.1. Vacinas comerciais contra Linfadenite caseosa

A maioria das vacinas licenciadas para fins comerciais é conjugada a outros patógenos com o intuito de maior estímulo da resposta imune, no entanto, a eficácia contra a *C. pseudotuberculosis* não foi alcançada.

Como exemplos de vacinas comerciais, pode-se citar: a Glanvac™3 (Pfizer), que é uma vacina composta de suspensões aquosa de toxóides ultrafiltrados de *C. pseudotuberculosis*, *Clostridium perfringens* Type D, *Clostridium tetani*. Outra vacina é a Biodectini® (Fort Dodge) que é baseada em proteínas inativadas (toxóides) de *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi* Type B, *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens* Type D, além de culturas inativadas de *Clostridium chauvoei*, *C. pseudotuberculosis* e moxidectina. (PIONTKOWSKI & SHIVVERS, 1998; STANFORD et al., 1998; WILLIAMSON, 2001). Também pode ser citada a Case-Bac™ (Jeffers Livestock), que é uma vacina com formulação de cultura inativada (bacterina) e toxóide de *C. pseudotuberculosis*. No Brasil, uma vacina viva atenuada de *C. pseudotuberculosis*, da linhagem 1002, foi licenciada desde o ano 2000 e continua a ser industrializada em versão liofilizada pela Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola². No entanto, apesar de apresentar 83% de proteção em caprinos em testes experimentais, essa vacina não fornece os mesmos índices em campo (RIBEIRO et al., 2014).

Outra observação importante é que as vacinas utilizadas apresentam aspectos negativos que devem ser considerados quanto à possibilidade de sua utilização. Como exemplo, nem todas as vacinas licenciadas para ovinos apresentam a mesma eficiência para caprinos, sendo necessário ajustar o programa de vacinação a cada caso (WILLIAMSON, 2001). Diante desse contexto se fazem necessárias mais pesquisas com o intuito de se conseguir uma formulação vacinal eficaz contra a LC.

² <http://www.ebda.ba.gov.br>

I.2.4.2. Vacinas experimentais

Avanços biotecnológicos em diversas áreas da pesquisa contribuem para o desenvolvimento de formulações vacinais mais seguras e eficazes, possibilitando avanços na referida área, tanto para uso em humanos quanto em animais. (DINIZ & FERREIRA, 2010). Esses avanços possibilitaram intensificar as pesquisas na busca por antígenos imunodominantes de *C. pseudotuberculosis*, destacando as pesquisas com vacinas recombinantes e vacinas de DNA tanto para caprinos como para ovinos.

I.2.4.2.1 Vacinas experimentais – Antígeno exotoxina fosfolipase D

Uma das primeiras estratégias utilizando antígenos imunodominantes foi o antígeno vacinal fosfolipase D (PLD), visto que é um dos fatores de virulência mais bem conhecidos, além de ser a proteína mais bem caracterizada de *C. pseudotuberculosis* (EGEN et al., 1989; HODGSON et al., 1990; SONGER et al., 1990; MCNAMARA et al., 1994). A PLD é uma potente exotoxina encontrada no citoplasma, e em menor quantidade na parede celular bacteriana (ALVES et al., 1997). Acredita-se que esta exotoxina está relacionada ao processo de invasão celular, aumentando a permeabilidade vascular local (EGGLETON et al., 1991). Chaplin e cols. (1999) construíram e testaram uma versão inativada da PLD apresentada em vacina de DNA na imunização de ovinos. O resultado obtido foi o de uma proteção parcial contra o desafio experimental com uma linhagem virulenta de *C. pseudotuberculosis*. Este resultado foi similar ao obtido pela vacina de subunidade inativada por formalina contra LC em ovinos (MUCKLE & GYLES, 1982; PATON et al., 1994; STANFORD et al., 1998).

I.2.4.2.2 Vacinas experimentais – Antígeno serina protease CP40

Outra proteína antigênica de *C. pseudotuberculosis* de 40kDa, denominada CP40, demonstrou desempenhar um papel importante na imunidade contra LC nos testes realizados em animais (SILVA et al., 2014). O antígeno CP40 é uma serina protease pertencente à família de protease corynebacterial. Essas proteínas estão envolvidas em

vários processos fisiológicos, tais como na coagulação sanguínea, na ativação da resposta imune e na morte dos tecidos. Elas também estão relacionadas às respostas imunitárias e ações pró-inflamatórias, principalmente na regulação específica de enzimas inflamatórias. Walter e cols. (1994) obtiveram 82% de proteção nos testes, em ovinos imunizados com a proteína CP40 semipurificada nativa de *C. pseudotuberculosis*, associada a adjuvante de hidróxido de alumínio. Entretanto o processo de purificação de proteínas é extremamente caro e dispendioso e, ainda, as vacinas de subunidades geralmente, não oferecem uma proteção duradoura, desta forma não preenchem os requisitos desejáveis para uma vacina.

I.2.4.2.3 Vacinas experimentais – Sistema de dois componentes: PhoPQ

O grupo de pesquisa do laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) buscando desenvolver uma vacina eficiente contra a LC optou por várias estratégias empregando ferramenta de engenharia genética. Um desses estudos foi o sistema de dois componentes: PhoPQ. Este é composto pela proteína citoplasmática reguladora de resposta celular (PhoP) e pela proteína transmembrânica histidina kinase (PhoQ). O sistema PhoPQ participa da regulação da expressão de um grande número de genes das mais variadas funções, tais como transportadores de fosfato de alta afinidade, fosfatases alcalina e fosfodiesterases, genes relacionados com os níveis de Mg^{2+} e Ca^{2+} no meio, fatores de virulência, dentre outras (ZWIR et al., 2005; ELDAKAK & HULETT, 2007).

O fosfato *regulon* ou PhoP *regulon* é um circuito regulatório global envolvido na administração de fosfato bacteriano que integra a disponibilidade de fosfato inorgânico (Pi) no meio extracelular com a correção de genes, mediando uma resposta adaptativa à limitação de Pi (ABDEL-FATTAH et al., 2005; MONDS et al., 2006). Estes sistemas controlam a função celular em resposta às condições do ambiente externo. Devido à ampla participação destes sistemas transdutores de sinal no metabolismo celular bacteriano, muitos deles tem sido alvo estratégico para o desenvolvimento de vacinas, também, em outros microrganismos.

Os testes pilotos de imunizações, em modelo murino, com a linhagem recombinante de *C. pseudotuberculosis* phoP (inativação do gene *phoP*) apresentaram proteção parcial, de aproximadamente 60% em camundongos BALB/c após desafiados. Essa linhagem foi capaz de induzir níveis significativos de IgG total, IgG1 e IgG2a, no

soro dos animais, indicando a indução de resposta imune Th1, que é caracterizada na eliminação de *C. pseudotuberculosis*, além de apresentar resposta Th2 (COSTA, 2011). Estes resultados iniciais são promissores, porém, ensaios complementares de resposta imunológica estão sendo realizados para melhor compreender tal proteção e avaliar a viabilidade de se usar esta linhagem como uma vacina alternativa contra a LC.

I.2.4.2.4 Vacinas experimentais – *C. pseudotuberculosis* recombinantes utilizando o sistema de transposição TnFuZ.

Um estudo realizado por Dorella e cols. (2006b) buscando identificar sequências de DNA que codificam proteínas exportadas por meio de mutagênese aleatória utilizando o sistema de transposição (*TnFuZ*), obtiveram 34 mutantes de *C. pseudotuberculosis*. Após experimentos de imunização com esses mutantes, dois deles se destacaram ao se obter 81% (CP13) e 60% (CP09) de proteção contra a infecção pela bactéria selvagem em camundongos BALB/c (DORELLA, 2009). Estes dados indicaram que tais mutantes poderiam ser alvos promissores para a obtenção de uma nova vacina viva atenuada contra a LC.

A linhagem CP09 de *C. pseudotuberculosis* apresentou um índice de proteção maior da que a vacina comercial GlanvacTM3 (Pfizer), sendo que esta apresentou 50% de proteção em modelo murino. Essa linhagem recombinante de *C. pseudotuberculosis* possui uma interrupção no gene que codifica uma proteína secretada com função de subunidade fimbrial. As fímbrias são particularmente interessantes, uma vez que a adesão mediada por elas, na colonização da superfície por microrganismos patogênicos é muito estudada. (FINLAY & COSSART, 1997; FINLAY & FALKOW, 1997; MATTOS-GUARALDI, FORMIGA, PEREIRA, 2000). A aderência bacteriana às superfícies de células hospedeiras é, muitas vezes, essencial para estabelecer uma infecção, pois favorece a associação do patógeno aos tecidos alvos. Assim, a adesão às células hospedeiras pode levar à internalização, seja por fagocitose ou por endocitose, induzida pela bactéria (FINLAY & COSSART, 1997; FINLAY & FALKOW, 1997).

A linhagem mutante CP13 de *C. pseudotuberculosis* foi a que apresentou resultados mais promissores. Este mutante foi capaz de conferir 81% de proteção contra a infecção pela bactéria selvagem em camundongos. Um resultado bastante interessante, visto que superou muito o nível de proteção oferecido pela vacina GlanvacTM3 (Pfizer),

comercializada e amplamente utilizada na Austrália.

A análise *in silico* do mutante *C. pseudotuberculosis* CP13, identificou a interrupção pela inserção do transposon, na sequência do gene *ciuA*, que codifica uma proteína secretada, a qual participa do sistema de transporte de ferro (DORELLA et al., 2006b). Em geral, proteínas relacionadas ao transporte de ferro são bastante utilizadas por bactérias patogênicas para “perceber” condições limitantes de ferro do hospedeiro e como um sinal ambiental para induzir a expressão de fatores de virulência. Além disso, o ferro modula a adesão bacteriana às células do hospedeiro e aumenta a capacidade da bactéria em desenvolver uma infecção persistente (BILLINGTON et al., 2002). Os bons resultados obtidos nos testes anteriormente mencionados serviram como base para uma patente³ deste promissor mutante como uma nova vacina viva atenuada contra a linfadenite caseosa.

Ademais, o grupo de pesquisa LGCM também avaliou a proteção em caprinos imunizados com a linhagem recombinante CP13 após o desafio. Nas análises quanto à modulação da resposta imune humoral, verificou-se que houve uma diferença significativa no aumento da produção de IgG quando comparado ao grupo controle. Foi avaliado também o perfil anatomopatológico que indicou uma redução tanto no número como na gravidade das lesões (quando houve) nos animais dos grupos vacinados, em comparação ao grupo não vacinado. Estes resultados indicaram que essa linhagem tem um grande potencial vacinal também em caprinos (RIBEIRO, 2013).

I.2.4.2.5 Vacinas experimentais – Associação entre vacina viva atenuada e vacina de subunidade

Outra estratégia estudada, utilizando a linhagem recombinante CP09 de *C. pseudotuberculosis*, foi a avaliação de diferentes formulações vacinais. Silva *et al.* (2014) manipularam a proteína recombinante CP40 (rCP40) conjugada ao adjuvante saponina e, realizaram testes em modelo murino em grupos com diferentes combinações de formulações de vacinas. Foram testadas as seguintes formulações: (1) proteína rCP40 associada a saponina; (2) *C. pseudotuberculosis* CP09; (3) combinação de *C. pseudotuberculosis* CP09 e rCP40 e uma estratégia (4) *prime-boost* heteróloga. As duas formulações combinadas (3 e 4) e rCP40 (1) apresentaram altos níveis de IgG1 e IgG2a.

³ Patente Número do registro: 014100003278

No entanto, a formulação contendo somente a linhagem viva *C. pseudotuberculosis* CP09 apresentou somente significativos índices de produção de IgG2a: resposta esperada para eliminação de microrganismo intracelular, como a *C. pseudotuberculosis*. Todas as formulações foram capazes de induzir uma resposta imune do tipo Th1, esperada para um bom candidato vacinal. Apesar de todas as formulações vacinais terem apresentado mais de 50% de proteção após o desafio, os resultados ainda não são os ideais para uma vacina comercial.

I.2.4.2.6 Vacinas experimentais – Utilização da *Corynebacterium pseudotuberculosis* como vetor de expressão

O desenvolvimento de vacinas vivas como vetores de expressão tem se mostrado bastante eficazes como meio de entrega de antígenos imunodominante capazes de modularem uma resposta imune protetora contra diversas patologias. A bactéria *C. pseudotuberculosis* vem sendo testada como vetor de expressão e vem apresentando resultados promissores. Moore e cols. (1999) utilizando a linhagem *C. pseudotuberculosis Toximinus* testou como vetor de expressão de várias proteínas heterólogas, a partir de diferentes promotores, com expressão tanto constitutiva quanto indutivo. Em geral os níveis de expressão eram baixos e verificou-se que algumas das proteínas recombinantes foram toleradas por *C. pseudotuberculosis Toximinus* melhor do que outros. Sendo assim, *C. pseudotuberculosis* demonstrou ter um potencial para serem utilizadas como um vetor como vacina viva na veterinária.

I.3. Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma doença infectocontagiosa crônica mundialmente distribuída, cujo agente etiológico é o *Toxoplasma gondii*. Apresenta grande importância médica e veterinária pela capacidade de infectar praticamente todas as espécies de homeotérmicos. A doença apresenta quadro clínico variado, desde infecção assintomática até manifestações sistêmicas extremamente graves (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010) e não variam muito entre as diferentes espécies susceptíveis a este protozoário.

Estima-se que cerca de um terço da população humana mundial tenha sido exposto ao patógeno (TENTER *et al*, 2000). A soroprevalência da doença apresenta grande variação dentre as populações do mundo e, até mesmo, entre diferentes regiões de um mesmo país, pois está relacionada às condições ambientais, aos hábitos alimentares e de higiene e à susceptibilidade do hospedeiro. Estima-se que 70 a 95% da população brasileira esteja infectada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Com relação à toxoplasmose em pequenos ruminantes, a prevalência é de aproximadamente 30% tanto em caprinos como em ovinos (FIALHO *et al*, 2009), entretanto, esses valores podem ser subestimados devido à dificuldade de diagnósticos da doença na sua forma subclínica.

I.3.1 Toxoplasmose em caprinos e ovinos

Nos rebanhos de pequenos ruminantes a toxoplasmose foi descrita pela primeira vez em ovinos em 1954 e somente depois de algumas décadas Munday & Mason, em 1979, identificaram a incidência também em caprinos, sendo considerado, desde então, a maior causada de problemas reprodutivos nessas espécies. Na pecuária, a importância econômica dessa infecção deve-se, principalmente, à fatores reprodutivos, visto que a transmissão congênita pode causar perdas significativas devido a abortos, ocorrência de natimortalidade, malformações fetais e nascimento de cordeiros fracos (DUBEY, 2010). Os abortos são mais frequentes em cabras e ovelhas comparados a outros animais de produção ou domésticos acometidos por este patógeno (LINDSAY *et al*, 1995).

No Brasil, a literatura sobre a toxoplasmose em pequenos ruminantes ainda é escassa, reduzido aos estudos sorológicos em alguns estados, que apresentam

soroprevalência bem diversificada. A literatura relata que a soroprevalência aumenta com a idade, Índices mais elevados de animais soropositivos estão relacionados com o aumento da idade dos mesmos, sugerindo que a maioria das ovelhas adquire a infecção após o nascimento (CAVALCANTE 2004, CARNEIRO 2006, RAGOZO 2007, GARCIA 2010, MEDEIROS 2010).

I.3.2 *Toxoplasma gondii*, o agente etiológico

O protozoário intracelular *Toxoplasma gondii* pertencente ao Filo Apicomplexa, (LINDSAY et al, 1995). O gênero foi classificado por Nicolle e Manceaux em 1908, como *Toxoplasma* devido à sua forma curvada (WEISS et al., 2009). O ciclo infeccioso de *T. gondii* é heteróxico facultativo, apresentando três estágios: esporozoítos, bradizoítos e taquizoítos. Os esporozoítos são a forma infectante oriunda do processo de reprodução sexuada de *T. gondii* que ocorre somente no hospedeiro definitivo (TENTER et al, 2000).

O ciclo de vida sexuada do parasito ocorre apenas no intestino de membros da família *Felidae* (DUBEY, 2010), que são os únicos hospedeiros definitivos. Na mucosa intestinal dos felídeos infectados não imunes, ocorre a diferenciação dos gametas, fecundação e formação de oocistos não esporulados que são liberados no ambiente juntamente com as fezes (ARAMINE et al, 1999). Dessa forma, os oocistos ao encontrarem condições adequadas de temperatura, umidade e oxigenação se tornam infectantes. Cada oocisto esporulado contém dois esporocistos com quatro esporozoítos (ARAMINE et al, 1999) e pode permanecer viável em ambiente úmido por até 18 meses (KAWAZOE, 2005), contaminando fontes de água e alimentos.

As demais espécies são classificadas como hospedeiros intermediários, não desenvolvem as formas sexuadas do parasito e não os liberam nas fezes (DUBEY, 2010). O ciclo assexuado ocorre em todos os hospedeiros intermediários e definitivos. A infecção pelo *T. gondii* ocorre seguida, principalmente, de uma rápida multiplicação de taquizoítos (forma assexuada de multiplicação rápida), os quais são liberados após a ruptura da célula infectada. Esses podem infectar qualquer célula nucleada e são altamente patogênicos, disseminando-se, preferencialmente, para as células do sistema nervoso central, olho, músculos esqueléticos e músculo cardíaco, levando a lesões teciduais e desenvolvimento da toxoplasmose aguda. A multiplicação dos taquizoítos é controlada pelo desenvolvimento de uma resposta imune protetora eficaz e,

consequentemente, ocorre à diferenciação do parasito em bradizoítos, forma de multiplicação lenta de *T. gondii*, o que resulta na formação de cistos teciduais e estabelecimento da fase crônica da doença (TENTER et al., 2000).

I.3.3 Transmissão da toxoplasmose

A transmissão da toxoplasmose ocorre principalmente por via oral, por meio da ingestão de oocistos contendo esporozoítos, liberados nas fezes de felídeos, ou pela ingestão de cistos contendo bradizoítos, presentes em carne crua ou mal cozida e, também, pelo consumo de leite de cabra contendo taquizoítos (SACKS *et al*, 1982), sendo esses fatores de grande importância na cadeia epidemiológica desta doença (BARIONE *et al*, 2009). Devido à contaminação de fontes de água, solo e pastagens com oocistos, grandes partes dos animais de produção são soropositivos para *T. gondii*. Outra forma de infecção é a congênita, que ocorre quando a fêmea é infectada durante a gestação ou devido à reativação da infecção crônica em gestantes com comprometimento imune, decorrente da transmissão transplacentária, principalmente pelos taquizoítos (CAETANO, 2005).

I.3.4 Imunopatogênese da toxoplasmose

A proteção contra a infecção por *T. gondii* é atribuída principalmente à imunidade mediada por células. Os mecanismos de resistência do hospedeiro parecem estar relacionados principalmente à síntese de IFN- γ por células *Natural Killers* (NK) e por linfócitos T. Após a infecção, na fase aguda, ocorre a ativação dos mecanismos inatos de defesa, mediados por macrófagos e células NK. Estes mecanismos limitam a replicação de taquizoítos antes da ativação de uma resposta imune mediada por células T e direcionam o desenvolvimento de uma resposta imune com perfil Th1 (DENKERS & GAZZINELLI, 1998). A ativação de células apresentadoras de antígeno pelo parasito promove a síntese de IL-12 como também de outras citocinas pró-inflamatórias, tais como: TNF- α , IL-1 β e IL-15. Estas citocinas induzem células NK a secretar IFN- γ , capaz de promover a ativação e a aquisição de atividade microbicida mediada por macrófagos. A ação conjunta de IL-12 e IFN- γ induz a diferenciação de precursores de linfócitos T auxiliares em linfócitos T CD4⁺ (GAZZINELLI *et al*, 1996). Estas células T CD4⁺

sintetizam grandes quantidades de IFN- γ e IL-2. As referidas citocinas, por sua vez, induzem a proliferação de linfócitos T CD8⁺ e a secreção de IFN- γ por estes linfócitos (POISSON, 2012). As células T CD8⁺ são responsáveis pela atividade citotóxica mediada por perforinas e granzimas presentes em seus grânulos, portanto, podem ser considerados importantes efetores na imunidade contra *T. gondii* na fase aguda e também previnem a reativação da infecção crônica (SUZUKI *et al*, 2010). Linfócitos T CD8⁺ são capazes de induzir apoptose em células infectadas por *T. gondii*, desta forma são capazes de eliminar os parasitos intracelulares ou também, através da lise celular, torná-los acessíveis ao ataque por anticorpos e conseqüentemente ao sistema complemento (DAUBENER *et al*, 1995). Assim, durante a resposta imune, ocorre um balanço entre citocinas mediadoras e citocinas reguladoras, caracterizada pela produção de IL-4, IL-10 e TGF- β (DENKERS & GAZZINELLI, 1998), que evitam danos ao hospedeiro, mas que podem beneficiar a persistência dos parasitos.

Embora a resistência à infecção possa ser adquirida pela transferência passiva de linfócitos T CD8⁺ (PARKER *et al*, 1991; CASCIOTTI *et al*, 2002), a transferência de anticorpos demonstra pouco efeito protetor (PAVIA, 1986). A infecção por *T. gondii* estimula a produção de imunoglobulinas específicas que podem ajudar no controle da disseminação do parasito, por meio de mecanismos de opsonização, que levam ao aumento da atividade fagocitária de macrófagos (ANDERSON *et al*, 1976; WILSON *et al*, 1980), bem como pela ativação do sistema complemento e lise de taquizoítos extracelulares. Estudos realizados com camundongos deficientes em linfócitos B sugerem que anticorpos podem não ser decisivos no processo de resistência durante a infecção aguda, mas podem ser importantes no controle de infecções crônicas (FRENKEL & TAYLOR, 1982).

A infecção primária por *T. gondii* resulta na ativação de uma resposta imune humoral e de uma rápida resposta mediada por células, que pode conferir proteção a longo prazo (POISSON, 2012). Os estudos sobre os eventos celulares e moleculares que induzem esta resposta protetora permite uma melhor concepção de estratégias para formulações vacinais que aumente a imunidade e diminua a morbidade e mortalidade associadas com a infecção pelo *T. gondii*. Sendo assim, o fato de que uma infecção primária induz uma proteção duradora observada tanto em animais infectados experimentalmente quanto em indivíduos naturalmente reinfetados (POISSON, 2012) sugere que é possível o desenvolvimento de vacinas eficiente e assim, muito estudos vem sendo realizados nesta área.

I.3.5. Tratamento e profilaxia contra a toxoplasmose em pequenos ruminantes

O controle terapêutico da toxoplasmose em ovinos e caprinos é realizado com a administração de antiparasitários como o decoquinato e monensina, bem como por antibióticos como as sulfas potencializadas (sulfa-trimetropin). Entretanto, o tratamento é preconizado apenas para os surtos de abortamento nos quais houve o diagnóstico laboratorial da doença. (BUXTON et al., 1996; RADOSTITS, et al., 2007; WEISSMANN, 2003).

A profilaxia contra a toxoplasmose é realizada por meio de medidas como o controle de gatos e roedores em ambientes rurais, armazenamento adequado de insumos e ração, medidas gerais de higiene nas instalações e nos instrumentos agropecuários. É importante salientar também os cuidados pessoais de funcionários (DUBEY, 2010), já que ainda não se tem vacinas comerciais eficazes.

I.3.6 Vacinas contra toxoplasmose caprina e ovina

A prevenção mais eficiente seria por meio da vacinação do rebanho, conferindo proteção contra a manifestação clínica, infecções persistentes (RADOSTITS et al., 2007) e, até mesmo, a erradicação da doença.

I.3.6.1 Vacinas comerciais contra toxoplasmose para uso na medicina veterinária

Para animais, especificamente ovinos, existe uma única vacina liberada comercialmente. Sua formulação é composta da linhagem S48 do *T. gondii* (MSD Animal Health / Toxovax[®]). Sua administração é capaz de proteger parcialmente as fêmeas contra a transmissão congênita do *Toxoplasma gondii* e consequente abortamento (BUXTON & INNES, 1995). Vacinas vivas atenuadas como a S48 são eficientes na ativação dos mecanismos de resposta imunológica do hospedeiro. No entanto, essa formulação, não induziu proteção completa contra a infecção ou contra a doença. Devido a que a referida vacina comercial protege somente contra a infecção da transmissão congênita, somente as fêmeas de ovinos são imunizadas. Para os caprinos, todavia, não existe nenhuma vacina comercial disponível.

I.3.6.2 Vacinas experimentais

Intensas pesquisas visando uma vacina contra a toxoplasmose tem sido realizadas. Várias estratégias vem sendo testadas para tentar reproduzir a proteção natural gerada pelo sistema imune do hospedeiro contra uma infecção (e reinfeção) por *T. gondii*. Entre elas estão incluídas vacinas baseadas em *T. gondii* inteiros (atenuados de diversas formas), nos antígenos solúveis produzidos com proteínas recombinantes purificadas (vacinas de subunidades) ou no uso de vetores vivos recombinantes que expressam antígenos heterólogos no organismo do hospedeiro (BRUNA-ROMERO *et al*, 2012). As primeiras vacinas desenvolvidas foram baseadas na utilização de parasitos (taquizoítos ou bradizoítos) atenuados, que tem a vantagem de estimular uma resposta imune semelhante a uma infecção natural, porém o uso de vacinas baseadas em parasitos vivos atenuados apresenta o risco de reversão a um estado virulento (KUR *et al*, 2009) não sendo consideradas seguras.

Nos últimos anos, o desenvolvimento de vacinas contra toxoplasmose tem se concentrado na identificação de componentes do protozoário *T. gondii* com propriedades imunogênicas que podem ser utilizados em vacinas de subunidades, vacinas de DNA ou em vetores vivos. Diversas proteínas secretórias como: micronemas (MIC), róptrias (ROP), grânulos densos (GRA) (DESOLME *et al*, 2000; MARTIN *et al*, 2004; LOURENCO *et al*, 2006) e antígenos associados aos bradizoítos, tais como o antígeno de bradizoíto (BAG) e o antígeno da matriz (MAG1)(KUR *et al*, 2009), já foram identificados e estão sendo testados.

I.3.6.2.1 Vacinas experimentais – Antígenos de superfície de *Toxoplasma gondii*

Os estudos atuais com o intuito de desenvolver vacinas contra a Toxoplasmose têm como principais alvos os antígenos de superfície de *T. gondii* (FILISSETTI & CANDOLFI, 2004). No protozoário *T. gondii*, as cinco maiores proteínas de membrana de taquizoítos são denominadas p22, p23, p30, p35 e p43 (CESBRON-DELAUW *et al*, 1994), dentre as quais, p23 (SAG1), p22 (SAG2) e p43 (SAG3) são abundantes na superfície dessa forma do parasito. Estes antígenos de superfície SAGs (“*Surface Antigens*”) desempenham um importante papel no processo de adesão e invasão celular. As sequências relacionadas à SAG (SRSs - “*SAG-Related Sequences*”) se encontram

ligadas à membrana por um motivo de adição de âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (NAGEL & BOOTHROYD, 1989). Estas sequências são altamente conservadas e compartilham um alto nível de homologia entre as linhagens de *T. gondii* do tipo I (patogênicas e letais em camundongos) e dos tipos II e III (cistogênicas) (BRUNAROMERO *et al*, 2012). Estes antígenos de superfície imunodominantes já foram expressos como proteínas recombinantes por bactérias, leveduras ou vírus (HARNING *et al*, 1996b; BIEMANS *et al*, 1998), e seu papel imunogênico já foi testado em diversos estudos utilizando vacinas de subunidades, vacinas de DNA e vetores vivos. Os resultados encontrados demonstram que as proteínas SAGs são considerados antígenos com potenciais para serem utilizados em formulações vacinais contra toxoplasmose, estimulando a continuidade das pesquisas.

1.3.6.2.1.1 Vacinas experimentais – Antígenos de superfície SAG2 de *Toxoplasma gondii*

A literatura relata que dentre os antígenos de superfície de *T. gondii* estudados, a proteína imunodominante SAG2 tem se destacado pelos resultados obtidos nos testes que investigam a modulação da resposta imune e proteção, nas diferentes estratégias utilizadas buscando uma formulação vacinal contra a toxoplasmose.

LUNDEN (1995) observou que o antígeno SAG2 purificado, associado a complexos imunoestimuladores (ISCOMS), foi capaz de ativar uma resposta imune humoral e celular e assim, ser capaz de produzir proteção parcial, reduzindo a resposta febril, contra desafio em ovinos com oocistos da cepa M3 de *T. gondii*.

Outro grupo de pesquisa testaram as proteínas SAG1, SAG2, SAG3, P54, SRS1 de *T. gondii*, com diferentes formulações nos testes de imunizações em camundongos BALB/c. Na preparação das formulações vacinais, ou as proteínas recombinantes individualmente, foram associadas com adjuvante Completo de Freund (CFA) ou os cinco antígenos foram misturados. Essas preparações foram inoculadas nos animais para a verificação da proteção tendo como parâmetros a taxa de sobrevivência e/ou a inibição na formação de cistos nos animais sobreviventes. Os resultados observados foram que essas formulações proporcionaram uma baixa taxa de sobrevivência (17 - 25%) dos animais, após o desafio com bradizoítos da cepa Berveley de *T. gondii*. Entretanto,

houve a inibição total na formação de cistos nos animais sobreviventes vacinados com SAG2r e SRS1r (MISHIMA *et al*, 2001).

Proteína recombinante SAG2 (rSAG2) também foi testada como vacina, sendo expressa como proteína heteróloga e tendo como vetores de expressão Adenovírus na imunização de camundongos BALB/c. A linhagem de Adenovirus rAd/SAG2 foi capaz de estimular uma potente resposta imune celular com perfil Th1 e apresentou elevadas titulações de anticorpos, como também a ativação de células T CD8⁺ específicas produtoras de IFN- γ . Foi observada também, uma redução significativa no número de cistos cerebrais, após o desafio, com cistos da cepa P-BR de *T. gondii*. Entretanto, os animais não apresentaram proteção ao desafio com taquizoítos da cepa RH, que é uma linhagem de *T. gondii* do tipo I, altamente virulenta, sendo letal para camundongos (CAETANO *et al*, 2006).

Outra estratégia abordada utilizando-se SAG2, que foi realizada por Machado e cols. (2010), empregaram vetores virais recombinantes de Influenza A (rFLU/SAG2) juntamente com Adenovírus (rAd/SAG2), ambos expressando SAG2. Nos testes de imunização em camundongos BALB/c com protocolos do tipo “*prime-boost*” heterólogos, observou-se que essas imunizações foram capazes de estimular tanto a resposta imune humoral, quanto a resposta imune celular específica para o antígeno SAG2, além de proteger após o desafio com a cepa P-Br de *T. gondii*, observando-se redução de 85% na carga parasitária.

Portanto, os relatos literários revelaram que a proteína rSAG2, além de ser imunodominante é bastante imunogênica e, assim, despertou o interesse de grupos de pesquisa em utilizá-la como antígeno vacinal contra a toxoplasmose em seus estudos. Sendo assim, Aguiar (2012) utilizou uma linhagem atenuada T1 de *C. pseudotuberculosis* como um vetor vivo para a expressão do antígeno SAG2 de *T. gondii*. Neste trabalho, foi possível detectar a expressão de SAG2 por *C. pseudotuberculosis* (CpSAG2)⁴. A bactéria recombinante foi usada, juntamente com um adenovírus humano recombinante, expressando o mesmo antígeno (AdSAG2). Os antígenos expressos pelos dois organismos (CpSAG2 e AdSAG2) foram capazes de estimular uma resposta humoral em todos os grupos vacinados. Ao final, os resultados deste estudo demonstraram que a expressão *in vivo* de SAG2 pela linhagem atenuada T1, assim como a imunogenicidade desta vacina bivalente nos animais inoculados, torna esta

⁴ Patente: Número do registro: BR 10 2013 01913

bactéria um vetor vivo promissor para a geração de formulações vacinais e que tolerou bem a expressão do antígeno SGA2 recombinante.

I.5. Justificativa

A ovinocaprinocultura no Brasil está criando novas possibilidades comerciais e se tornando bastante expressiva. Isso devido à implantação de explorações extensivas voltadas, principalmente, para a produção de carne, leite e derivados e aproveitamento da pele (SEBRAE, 2012). Apesar do desenvolvimento de novas tecnologias e de modelos de sistemas de produção visando o bem estar e a saúde animal e a qualidade dos alimentos, a produção de caprinos e ovinos, não consegue atingir todo seu potencial (MAPA, 2014). Podemos citar como causas para esse quadro, o manejo inadequado e a persistência de diversas doenças no rebanho. Dentre elas destacam-se, a LC e a toxoplasmose, ambas são doenças infectocontagiosas crônicas mundialmente distribuídas, que causam grandes prejuízos econômicos aos produtores (MAPA, 2014).

A LC acomete principalmente caprinos e ovinos, caracterizada pela formação de abscessos em gânglios linfáticos superficiais, podendo também acometer órgãos e linfonodos internos (ALVES et al., 2007), causando redução na produção de lã, carne e leite, e também a desvalorização da pele. A toxoplasmose apresenta quadro clínico variado, desde infecções assintomáticas a manifestações sistêmicas extremamente graves. Na pecuária, a transmissão congênita da toxoplasmose causa abortos, ocorrência de natimortalidade, malformações fetais e nascimento de cordeiros fracos, sendo esses um grande problema para os produtores. Outro ponto importante sobre a toxoplasmose, é que a erradicação da doença nos rebanhos eliminaria uma importante via de transmissão para a espécie humana, por meio do fornecimento de produtos alimentícios derivados de pequenos ruminantes livres do patógeno. Apesar da alta incidência dessas doenças ainda não tem tratamentos eficazes e vacinas.

Considerando que as vacinas são as formas mais eficientes de se combater doenças infectocontagiosas, várias pesquisas buscam uma formulação vacinal eficaz para essas patologias. Nosso grupo de pesquisa, LGCM, dentre as várias estratégias testadas, a que mais tem se destacado é a utilização de uma linhagem recombinante de *C. pseudotuberculosis*, deficiente para a aquisição de ferro, como vacina viva atenuada contra a LC. Nos testes de imunização a linhagem CP13 apresentou 80% de proteção em modelo murino e 50% de proteção em caprinos após o desafio com a linhagem virulenta. A mutação da *C. pseudotuberculosis* CP13, foi obtida por mutagênese aleatória utilizando o sistema de transposição TnFuZ, que foi inserida no DNA

genômico interrompendo o gene *ciuA*. Esse gene codifica uma proteína que participa do processo de captação de ferro, mecanismo importante de sobrevivência no meio intracelular (DORELLA et al., 2009). Grandes esforços também tem sido feito buscando uma vacina eficaz contra a toxoplasmose. Pesquisas em identificar antígenos imunodominante de *Toxoplasma gondii* para serem utilizados como alvos para formulações vacinais estão sendo realizadas. Nos estudos com os antígenos de superfícies, que tem apresentando bons resultados, se destaca a p22 ou SAG2. A SAG2 é um dos antígenos mais abundantes na superfície de taquizoítos e seu potencial imunogênico também já foi testado. Nos testes utilizando diversos microrganismos com vetor de expressão para SAG2 e vacinas de DNA, observaram redução significativa na carga parasitária após imunização e desafios, com linhagem virulenta, em modelo murino (HARNING et al., 1996a; BIEMANS et al, 1998).

Neste contexto, a possibilidade do desenvolvimento de uma vacina viva, baseada em uma linhagem atenuada de *C. pseudotuberculosis* CP13, expressando o antígeno rSAG2 de *T. gondii*, que forneça uma proteção dupla contra esses patógenos seria de grande interesse biotecnológico e comercial. A *Corynebacterium pseudotuberculosis* já foi testada como vetor vivo para a administração de antígenos heterólogos com sucesso, sendo capaz de induzir uma resposta imune humoral e celular contra diversos antígenos (MOORE et al., 1999). Aguiar (2012) também utilizou uma linhagem selvagem de *C. pseudotuberculosis* como vetor de expressão da proteína rSGA2 e verificou que a bactéria foi capaz de expressar e secretar corretamente a referida proteína, e também de estimular resposta imune específica em modelo murino.

Assim, o desenvolvimento de vacinas com formulações que contenham em sua composição antígenos capazes de gerar proteção contra várias doenças é uma tendência. Desta forma, uma vacina bivalente contra LC e a toxoplasmose apresentam vantagens econômicas como uma redução considerável nos custos de administração de duas vacinas, com um protocolo único de imunização, como também nos custos de produção (AGUIAR, 2012).

II. OBJETIVOS

II.1 Objetivo Geral

- Desenvolver uma vacina bivalente contra a linfadenite caseosa e a toxoplasmose, com base na utilização de uma linhagem viva atenuada de *C. pseudotuberculosis* produtora do antígeno rSAG2 de *T. gondii*.

II. 2 Objetivos específicos

- Clonar a ORF rSAG2 em plasmídeos de expressão heteróloga em corinebactérias;
- Construir linhagens recombinantes de *C. pseudotuberculosis* CP13, a partir de clonagem da ORF rSAG2 em plasmídeos de expressão heteróloga para *Corynebacterium* sp;
- Verificar a capacidade de expressão da proteína SAG2 pelas linhagens recombinantes *C. pseudotuberculosis* CP13;
- Analisar o perfil de virulência e persistência das linhagens recombinantes de *C. pseudotuberculosis* em modelo murino.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. Soluções e meio de cultura.

Acetato de Potássio 3M: 60 mL de KOAc 5M; 11,5 mL de Ácido acético glacial e 28,5 mL de água ultrapura autoclavada.

Acetato de Sódio 3M: 246 g NaOAc em q.s.p. de 1 L de água destilada.

Ampicilina (100 mg/mL): 1 g da solução de ampicilina em q.s.p. de 10 mL de água ultrapura autoclavada.

Acrilamida/Bisacrilamida: 29,2 g de acrilamida, 0,8 g de bisacrilamida e água ultrapura q.s.p. 100 mL.

Brometo de etídio: Solução 0,1-0,5 µg/mL.

Cloreto de Sódio 5M: 14,51 g de NaCl em q.s.p. de 50 mL de água destilada.

EDTA 0,5M: 18,61 g de EDTA em q.s.p. de 100 mL de água destilada; pH 8,0.

Etanol 70%: 70 mL de etanol absoluto e 30 mL de água destilada.

Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico (25:24:1): 25 mL de solução saturada de fenol; 24 mL de clorofórmio; e 1 mL de álcool isoamílico.

Gel de Poliacrilamida 18% (separação): 5 mL de acrilamida/bisacrilamida; 3 mL de Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 100 µL de SDS 10%; 1,84 mL de água ultrapura; 70 µL de PSA 10% e 14 µL de TEMED.

Gel de Poliacrilamida 4% (concentração): 650 µL de acrilamida/bisacrilamida; 1,25 mL de Tampão Tris-HCl 0,5 M pH6,8; 50 µL de SDS 10%; 3,05 mL de água ultrapura; 35 µL de PSA 10% e 7 µL de TEMED.

GET com RNAase: 25 ml de solução GET e 250 µL de RNase (10 mg/mL).

Glicerol 10%: 100 mL de Glicerina em q.s.p. de 1L de água destilada
Glicerol 80%: 80 mL de Glicerina em 50 mL de água destilada.

GET: 23 mL de glicose 20%; 10 mL de EDTA 0,5M pH 8,0 autoclavado; 13 mL de Tris-HCl 1M, pH 7,4 em q.s.p. de 500 mL de água ultrapura.

Glicogênio (20mg/ml): 100 mg de glicogênio em q.s.p. de 5 mL de água destilada.

Glicose 20%: 20 g de glicose em q.s.p. de 100 mL de água ultrapura.

Glicose 50%: 50 g de glicose em q.s.p. de 100 mL de água ultrapura.

Hidróxido de Sódio 4M: 8 g em q.s.p. de 40 mL de água ultrapura.

Meio BHI – ágar-canamicina: BHI – ágar acrescido de canamicina (50 µg/mL).

Meio BHI – ágar-clorafenicol: BHI – ágar acrescido de clorafenicol (4,5 µg/mL).

Meio BHI-caldo contendo Tween 80: BHI caldo e 0,05% de Tween 80. Autoclavação por 20 min a 120°C.

Meio BHI-caldo: 37 g de BHI em pó em q.s.p. de 1 L de água destilada; pH 7,4. Autoclavação por 20 min a 120°C.

Meio LB-ágar: Peptona 10 g/L; Extrato de levedura 5 g/L; NaCl 5 g/L e 15 g de ágar bacteriológico. pH 7,8. Autoclavação por 20 min a 120°C.

Meio Luria-Bertani (LB): Peptona 10 g/L; Extrato de levedura 5 g/L; NaCl 5 g/L. pH 7,8. Autoclavação por 20 min a 120°C.

PBS-T: A solução estoque de PBS 10X concentrado foi realizado com: 0,5 M de NaH₂PO₄; 650 mL de água ultrapura; Aferir o pH para 7,4; A cada 100 mL da solução adicionar 9 g de NaCl; Diluir 1:10 em água ultrapura; Adicionar Tween-20 0,05%.

III.2 Material biológico

III.2.1 Linhagens, plasmídeos e condições de cultivo.

As linhagens bacterianas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* MIC6 e CP13 (Tabela 1) foram cultivadas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubadas a 37°C por 48 horas. Para a linhagem recombinante *C. pseudotuberculosis* CP13:SAG2, o meio foi suplementado com canamicina (25 µg/µL) e clorafenicol (4,5 µg/µL) (LEE, 2014). A linhagem de *Escherichia coli* TOP10® (Tabela 1) foi cultivada em meio *Luria Bertani* (LB) e incubada a 37°C por 16 horas, sob agitação (160 rpm), o meio foi suplementado com canamicina (50 µg/µL) e clorafenicol (4,5 µg/µL) (LEE, 2014).

Tabela 1 - Microrganismos utilizados neste trabalho.

Linhagem	Características	Referência
<i>Escherichia coli</i> TOP10®	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu) 7697 galE15 galK16 rpsL (Str ^R) endA1 λ -	Invitrogen
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> T1	Linhagem selvagem	UFBA
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> CP13	Parental da linhagem <i>C. pseudotuberculosis</i> T1(TnFuz / Km ^r)	DORELLA et al., 2006b
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> MIC6	Linhagem selvagem	UFBA
<i>Toxoplasma gondii</i> Me49	Tipo III - Cistogênica	Lab. Parasitologia-UFMG
<i>Toxoplasma gondii</i> RH	Linhagem humana-Tipo I – Letal para camundongos	Lab. Parasitologia-UFMG
<i>Adenovirus</i> SAG2	Linhagem humana pJM17/ pAd-SAG2	CAETANO, 2005

As linhagens de protozoários *Toxoplasma gondii* Me49 e RH foram mantidas em camundongos *Swiss*. Na linhagem *T. gondii* Me49 foram inoculados 5 a 10 cistos recuperados de cérebros de camundongos infectados, que foram macerados, contados e inoculados via intragástrica. O repique da linhagem de *T. gondii* Me49 foi realizado em média a cada dois meses. Para a linhagem *T. gondii* RH o repique foi realizado a cada

três dias, via intraperitoneal, com taquizoítos recuperados por lavagem intraperitoneal, após a eutanásia do animal. Ambas as linhagens de *T. gondii* foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor, do Departamento de Parasitologia da UFMG.

O adenovírus recombinante (AdSAG2) foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Oscar Bruna-Romero, do departamento Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC. O AdSAG2 codifica o antígeno de superfície SAG2 de *T. gondii*, e foi gerado por meio da co-transfecção e recombinação homóloga intracelular entre o plasmídeo pJM17, que contém o genoma do adenovírus humano tipo 5, e o vetor de transferência pAd-SAG2 (Caetano, 2005). Os adenovírus purificados foram mantidos armazenados a -70°C em alíquotas de 200 µL (Aguiar, 2012).

Os plasmídeos de expressão utilizados foram: pCXS35, pCXI40, pCXI45 e pECTACK99-PS-SAG2 listados na Tabela 2 com suas características mais relevantes.

Tabela 2 - Plasmídeos utilizados neste trabalho.

Plasmídeos/Vetores de Expressão	Características relevantes	Referência
Zero Blunt®	(<i>P_{lac}</i> / <i>lacZα</i> / <i>Km^r</i> / <i>pUC ori</i>)	Invitrogen
pCXS35	(<i>P_{sod-M}</i> / <i>SD</i> / <i>Cm^r</i> / <i>pUC ori</i> / <i>pBL1 ori</i> / <i>NotI</i> / <i>XbaI</i> / <i>KpnI</i> / <i>NheI</i>)	LEE, 2014
pCXI40	(<i>P_{ilvC}</i> / <i>Cm^r</i> / <i>pUC ori</i> / <i>pBL1 ori</i> / <i>NotI</i> / <i>XbaI</i> / <i>KpnI</i> / <i>NheI</i>)	LEE, 2014
pCXI45	(<i>P_{silvC-M2}</i> / <i>SD</i> / <i>Cm^r</i> / <i>pUC ori</i> / <i>pBL1 ori</i> / <i>NotI</i> / <i>XbaI</i> / <i>KpnI</i> / <i>NheI</i>)	LEE, 2014
pECTACK99-PS-SAG2	(<i>P_{lac}</i> / <i>Km^r</i> / <i>rSAG2</i> / <i>PS-PLD</i> / <i>RBS</i> / <i>EcoRI</i> / <i>XmaI</i> / <i>XbaI</i>)	AGUIAR, 2012

III.2.2 Confeção dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos foram desenhados a partir da sequência do plasmídeo pECTACK99-PS-SAG2 (AGUIAR, 2012), considerando um tamanho de aproximadamente 30pb e temperatura de anelamento dos pares de *primers* em torno de 60°C (Tabela 2 3), esses parâmetros foram analisados pelo *software* “*Primer Express v2.0 (Applied Biosystems™)*”. Para a realização das análises quanto às probabilidades de formações de grampos, homodímeros e heterodímeros e estruturas que podem baixar a

eficiência de amplificação pela PCR, foi utilizada a ferramenta “*Oligo analyzer v3.1*” (*IDT SciTools*).

Tabela 3 - Iniciadores para ORF SAG2.

Vetores	Sequência	Oligonucleotídeos e enzimas de restrição
pCXS35	SAG2 FW	5'GTTTgAATTCTGACTTGGTGATAAAAAATGAG3'/EcoRI
	SAG2RV	5'GCCAAGCTTTTAGAGAGACACAGGGTCAAATCC3' / HindIII
pCXI40 e pCXI45	SAG2 FW	5'AGATTgAATTCTGACTTGGTGATAAAAAATGAG3'/EcoRI
	SAG2RV	5'GCCAAGCTTTTAGAGAGACACAGGGTCAAATCC3'/HindIII

III.2.3 Animais e parâmetros da infecção

Para os testes *in vivo* foram utilizados camundongos BALB/c com idades entre seis a oito semanas. A escolha desta linhagem deveu-se à sua susceptibilidade à infecção por *C. pseudotuberculosis*. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo do ICB/UFMG. Todos os procedimentos foram realizados seguindo as normas do comitê de ética desta instituição de pesquisa (CETEA/UFMG).

A padronização de parâmetros de infecção, tais como volume das culturas a ser inoculadas, via de inoculação adequada, preparo das doses, intervalos entre a imunização e cálculo da dose letal (LD50), foi realizada de acordo com DORELLA (2009), SIMMONS e cols. (1997) e CAETANO (2006).

III.3 Subclonagem em vetor de replicação *Zero Blunt*®

III.3.1 Amplificação da ORF SAG2 em vetor de expressão

A amplificação do fragmento de DNA de 550pb, contendo a sequência codificadora do gene SAG2, foi realizada a partir do plasmídeo pECTACK99-PS-SAG2 (cedido pelo Prof. Dr. Oscar Bruna-Romero / UFSC) e, para isso, foram utilizados os iniciadores listados na Tabela 3. A sequência deste inserto não possui âncora de

glicosilfosfatidilinositol (GPI) e foi adicionada a sequência de reconhecimento para a enzima de restrição *Hind*III.

A reação de PCR foi realizada em um volume de 20 μ L compreendendo: 5 μ L de tampão de amplificação 5x Q5[®], 1 μ L de dNTP 10mM Invitrogen[®], 0,3 μ L da enzima DNA polimerase alta fidelidade Q5[®], 0,7 μ L *primer forward* e *primer reverse*, ambos a 100pMoles/ μ L, 1 μ L de Dimetil sulfóxido (DMSO) e água ultrapura q.s.p. para volume final de 20 μ L. Os ciclos para as reações de amplificação foram padronizados sob as seguintes condições: primeira desnaturação a 98°C, durante 30 segundos, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 98°C, durante 10 segundos; anelamento dos *primers* a 60°C, por 30 segundos; extensão a 72°C, durante 1 minuto, e extensão final por 2 minutos a 72°C. O produto da PCR foi resolvido em gel de agarose na concentração de 1%, corado com brometo de etídio, com concentração final de 0,5 μ g/mL e, em seguida, foi purificada utilizando o Kit Qiagem[®] (seguindo as recomendações do fabricante).

III.3.2 Preparação das células eletrocompetentes da linhagem *Escherichia coli* TOP10[®]

Com o objetivo de se obter células eletrocompetentes da linhagem *E. coli* TOP10[®], foi realizado esgotamento de cultura bacteriana em placa de *petri* contendo meio LB ágar e incubada a 37°C por 24 horas. Em seguida, uma colônia isolada foi inoculada em 50 mL de meio LB líquido e incubada a 37°C por 16 h sob agitação. Após 16 horas, 3 mL da cultura foi inoculada em 300 mL de LB e incubada a 37°C, sob agitação, até atingir uma densidade óptica a 600nm (DO600) entre 0,2 e 0,3. Ao atingir a densidade óptica desejada, a cultura foi mantida em gelo por 30 minutos e distribuída em seis tubos de 50 mL, com 40 mL de cultura. Na sequência, as culturas foram centrifugadas a 4.000 rpm por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O precipitado celular foi lavado com a adição de 40 mL de glicerol 10% estéril gelado e as células foram ressuspensas. Em seguida, as culturas foram novamente centrifugadas a 4000 rpm por 20 minutos a 4°C. Estes processos de centrifugação e lavagem foram repetidos mais três vezes. Após a última lavagem, o precipitado já todo unificado foi ressuspensão em 1 mL de solução glicerol 10% e alíquotas de 100 μ L foram estocadas em ultra freezer a -80°C.

III.3.3 Eletrotransformação em *Escherichia coli* TOP10[®]

O *amplicon* purificado correspondente a ORF SAG2 foi submetido a uma reação de ligação. A reação de ligação foi realizada como a seguir: 4µL de 5x Ligase *reaction Buffer*, 1µL do vetor *Zero Blunt[®] PCR Cloning Kit* (Figura 1), 3µL do inserto SAG2, 1µL(0.1U/µl) T4 DNA ligase da Invitrogen[™] (*Life technologies*) e água ultrapura q.s.p. 20µL. A reação foi incubada à temperatura ambiente (~24°C), *overnight*.

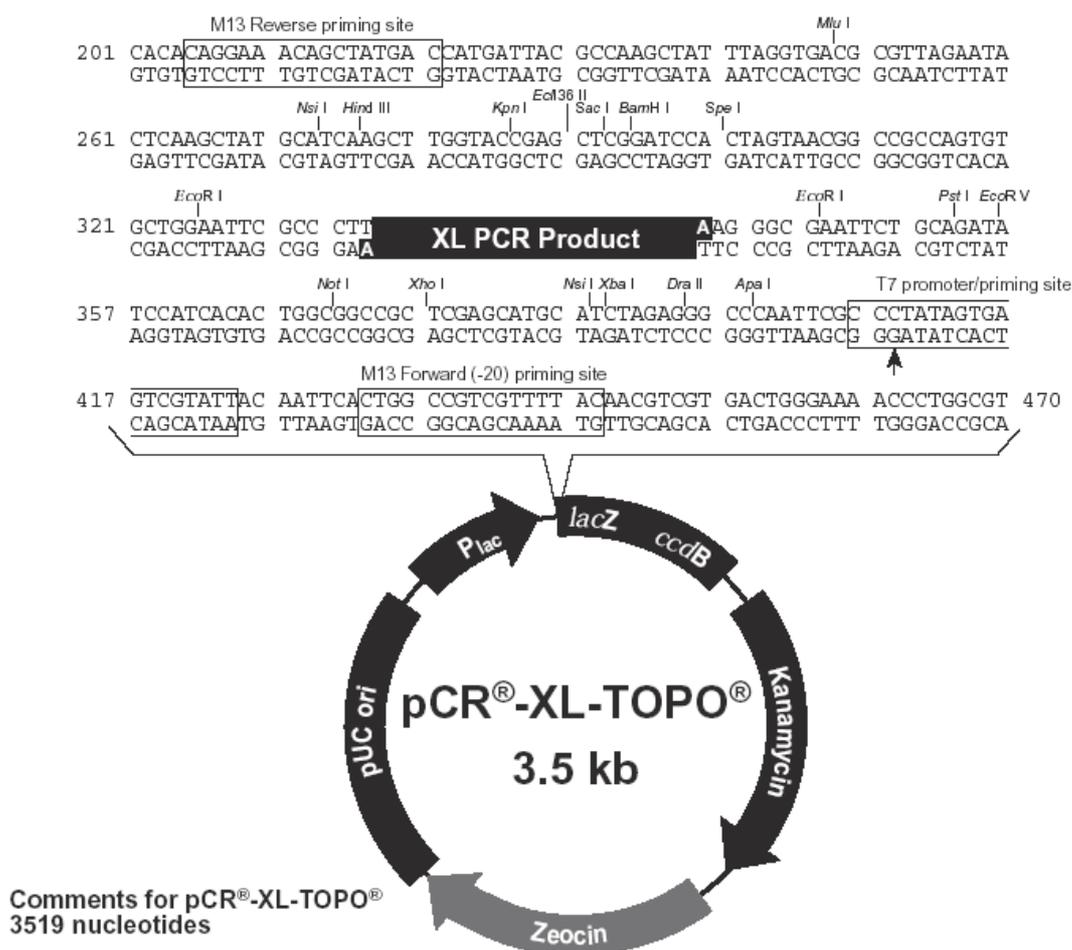


Figura 1 - Representação esquemática do vetor *Zero Blunt[®]*, destacando-se o sítio de clonagem múltipla do mesmo. Os sítios das respectivas endonucleases de restrição estão indicados no local da clivagem. As setas indicam o início da transcrição para T7 e SP SP6 polimerases. A sequência de anelamento dos *primers* SAG2 *Forward* e *Reverse*, utilizados para o sequenciamento do produto da PCR (inserto), estão destacados na figura (Fonte: User Manual *Zero Blunt[®] PCR Cloning Kit*, Invitrogen).

Para a realização das eletrotransformações, alíquotas (100µL) de *E. coli* TOP10[®] eletrocompetentes foram descongeladas no gelo e à elas, foram adicionados 100ng de

cada produto de ligação vetor *Zero Blunt*[®]. A mistura foi transferida para as cubetas de eletroporação (2mm) (*BioAgency*), previamente resfriadas. As amostras foram submetidas a um pulso de 2.500V. Imediatamente após o pulso, adicionou-se 1 mL de meio LB e a mistura foi incubada em banho-Maria a 37°C por uma hora. Em seguida, 100µL dessa cultura foi semeada e o restante foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e 100µL restantes das células foram semeadas em placas de *petri* contendo meio de cultura LB ágar, suplementado com canamicina (50µg/mL), e incubadas a 37°C durante 24 horas. A etapa seguinte consistiu na seleção de clones das placas de *petri* para proceder à confirmação da presença do inserto SAG2 no plasmídeo.

III.3.4 Confirmação da subclonagem *Escherichia coli* TOP10[®]

III.3.4.1 Extração do DNA plasmidiano de *Escherichia coli* TOP10[®]

Para a confirmação da subclonagem em *E. coli* TOP10[®], primeiramente foi realizada a extração do DNA plasmidiano. Para isso, as colônias foram inoculadas em 5mL de meio LB suplementado com canamicina (50µg/mL) e mantidas por cerca de 18 horas incubadas a 37°C sob agitação. Os inóculos foram transferidos para os microtubos e prosseguiu-se com a extração dos DNAs plasmidiano utilizando o *kit Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), conforme recomendação do fabricante e também pelo método de lise alcalina descrito por Sambrook e Russel (2001).

III.3.4.2 Confirmação da presença e do tamanho do inserto SAG2 no plasmídeo *Zero Blunt*[®]

Para verificar a presença do inserto e o peso molecular do fragmento de DNA clonado no vetor *Zero Blunt*[®], o inserto do DNA plasmidiano foi amplificado por PCR utilizando-se os mesmos iniciadores descritos na Tabela 3. Esses mesmos DNAs também foram submetidos à reação enzimática com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*.

A reação de PCR foi realizada em um volume de 20 μ L, compreendendo: 5 μ L de tampão de amplificação 5x (Phoneutra), 1 μ L de dNTP 10mM (Invitrogen), 1,5 μ L de MgCl₂ 25 mM (Invitrogen), 0,3 μ L da enzima DNA polimerase Phoneutra, 0,7 μ L de *primer forward* e *primer reverse*, ambos SAG2 a 100pMoles/ μ L e água ultrapura q.s.p. 20 μ L. Os ciclos para as reações de amplificação foram padronizados sob as seguintes condições: primeira desnaturação a 98°C durante 30 segundos, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 98°C durante 10 segundos; anelamento dos *primers* a 60°C por 30 segundos; extensão a 72°C durante 1 minuto; e extensão final por 2 minutos a 72°C. O produto da PCR foi resolvido em gel de agarose na concentração de 1%, corado com brometo de etídio com concentração final de 0,5 μ g/mL e, em seguida, foi purificado utilizando-se o Kit Qiagen®, seguindo as recomendações do fabricante.

A reação de digestão foi realizada em um volume de 20 μ L, que consistiu em 10 μ L de DNA plasmidial (100 ng/ μ L), 2 μ L de tampão R (Invitrogen), 1 μ L da enzima *Hind*III (Invitrogen), 1 μ L da enzima *Eco*RI (Invitrogen) e 6 μ L de água ultrapura estéril. A reação foi mantida a 37°C por 18 horas. Logo após, 10 μ L da reação de digestão foram depositados e resolvidos em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio com concentração final de 0,5 μ g/mL.

III.4 Clonagens nos plasmídeos de expressão pCXS35, pCXI40 e pCXI45

Os vetores selecionados para as clonagens e expressão da proteína recombinante SAG2 (rSAG2) foram os vetores de expressão pCXS35, pCXI40 e pCXI45 desenvolvidos para *Corynebacterium glutamicum* (LEE, 2014). Esses três sistemas de vetores possuem os fortes promotores P_{SOD}, com uma sequência de *Shine-Dalgarno* (SD) conservada de *C. glutamicum*, P_{ilvC} e P_{ilvC} conservada SD-2 (P_{ilvC}-M2) com modificação, respectivamente, e apresentam também um sítio múltiplo de clonagens (MCS-4) contendo os sítios de restrições para as enzimas *Eco*RI, *Bam*HI, *Pst*I, e *Hind*III e um terminador transcricional *rrnB* (T_{*rrnB*}). Os sítios múltiplos de clonagens permitem uma maior liberdade de clonagem e expressão de diferentes genes.

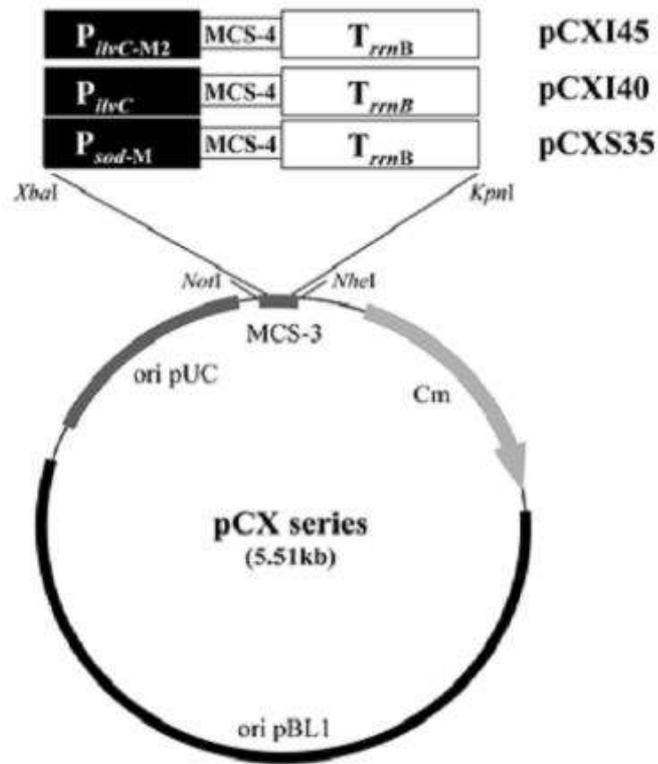


Figura 2 - Diagrama esquemático de vetores de expressão: pCXs35, pCXI40 e pCXI45 contendo os promotores, *P_{SOD}* com uma SD conservada; *P_{iltC}* e *P_{iltC}* com uma conservada SD-2, respectivamente. Adaptado de LEE, 2014.

A reação de ligação foi realizada como segue: 4 μ L de 5x Ligase *reaction Buffer*, 1 μ L do vetor pCXs35 ou pCXI40, 3 μ L do inserto SAG2, 1 μ L (0.1U/ μ l) T4 DNA ligase da Invitrogen™ (*Life technologies*) e água ultrapura q.s.p. 20 μ L. A reação foi deixada *overnight* a temperatura ambiente ($\sim 24^{\circ}\text{C}$). Em seguida, foi realizada a eletrotransformação com 100 μ L de células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10 adicionada 10 μ L da reação da ligação, como descrito no item III.6.3. As confirmações tanto por PCR quanto por digestão foram realizadas conforme o item III.6.4.2.

III.4.1 Preparação das células eletrocompetente da linhagem *C. pseudotuberculosis* CP13

O preparo de células eletrocompetente da linhagem de *C. pseudotuberculosis* CP13 foi realizado a partir do esgotamento de cultura da *C. pseudotuberculosis* CP13 em placa de *petri* contendo meio BHI e incubada a 37°C por 48-72h. Em seguida, uma colônia isolada foi adicionada a 50 mL de meio BHI líquido e incubada a 37°C por 24h, sob agitação. Após 24 horas, 3 mL da cultura foram inoculados em 300 mL de BHI e incubados a 37°C, sob agitação, até atingir uma DO600 entre 0,2 e 0,3. Ao atingir a DO600 desejada, a cultura foi mantida em gelo por 30 minutos e distribuída em seis tubos de 50 mL com 40 mL de cultura. Na sequência, as culturas foram centrifugadas a 4.000 rpm por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O precipitado celular foi lavado com a adição de 40 mL de glicerol 10% estéril gelado e as células foram ressuspensas. No próximo passo, as culturas foram novamente centrifugadas a 4000 rpm por 20 minutos a 4°C. Estes processos de centrifugação e lavagem foram repetidos mais três vezes. Após a última lavagem, o precipitado já todo unificado foi ressuspensão em 1 mL de solução glicerol 10% e alíquotas de 100 µL foram estocadas em ultra freezer a -80°C.

III.4.2 Eletrotransformação na linhagem *Corynebacterium pseudotuberculosis* CP13

Para a realização das eletrotransformações, alíquotas (100µL) de células eletrocompetentes de *C. pseudotuberculosis* CP13 foram descongeladas no gelo e, em seguida, foram adicionados 100ng de cada ligação nos plasmídeos pCXS35, pCXI40 e pCXI45. A mistura foi transferida para as cubetas de eletroporação (2mm) (BioAgency), previamente resfriadas. As amostras foram submetidas a um pulso de 2.500V. Imediatamente após o pulso, adicionou-se 1 mL de meio BHI e realizou-se incubação em banho Maria a 37°C por uma hora. Em seguida, 100 µL foram plaqueadas e o restante foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e 100µL restantes das células foram semeados em placas de *petri* contendo meio de cultura BHI ágar suplementado com cloranfenicol (4,5 µg/mL) e, posteriormente foram incubados a 37°C durante 48-72 horas. A etapa seguinte consistiu na seleção de clones

das placas para realizar a confirmação da presença do inserto SAG2 nos diferentes plasmídeos.

III.4.3 Confirmação da clonagem *Corynebacterium pseudotuberculosis* CP13

III.4.3.1 Extração do DNA plasmidiano de *Corynebacterium pseudotuberculosis* CP13

As colônias resultantes da transformação de *C. pseudotuberculosis* CP13 com os plasmídeos pCXS35:*SAG2*, pCXI40:*SAG2* e pCXI45:*SAG2* foram inoculadas em 5 mL de BHI suplementado com cloranfenicol (4,5 µg/mL) e a cultura mantida a 37°C por, aproximadamente, 24 horas.

Uma alíquota de 1 mL de cada cultura foi estocada a -80°C utilizando glicerol 80% na proporção de 1:3 (glicerol:cultura). O restante do inóculo foi transferido para tubos de microcentrifuga e procedeu-se com a extração de plasmídeos pelo método de lise alcalina, descrito por Sambrook e Russel (2001) com algumas modificações. Em resumo, 4 mL de um inóculo cultivado por, aproximadamente, 18 horas e a 37°C, foram centrifugados por 7 minutos a 13.000 rpm e o precipitado celular coletado e ressuspenso em 250 µL de TE-Lisozima (TE-LYS). A mistura foi incubada em banho Maria a 37°C por 1 hora. Em seguida, 400 µL da solução de Lise foram acrescentados à mistura anterior. Após 2 minutos, foram adicionados 100 µL de clorofórmio e, logo em seguida, 300 µL da solução de neutralização. A mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante (cerca de 500 µL) foi coletado em novos tubos, onde foi feita a adição de 2,5 volumes de etanol absoluto, 10% de Acetato de Sódio (3 M) e 1% de Glicogênio (20 mg/mL). Os tubos foram então incubados por, aproximadamente, 30 minutos em freezer a -80°C. Após esse período, foram centrifugados por 15 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante descartado. Após lavagem com etanol 70% (1 mL), o precipitado foi ressuspenso em 20 µL de água ultrapura estéril. Quando necessário, o DNA foi tratado com 1 µL de RNase A (100 µg/mL) e incubado a 37°C por uma hora. A presença e a qualidade dos plasmídeos foram verificadas por meio de resolução em gel de agarose com concentração de 1%, corado com brometo de etídio com concentração final de 0,5 µg/mL.

III.4.3.2 Confirmação da presença e do tamanho do inserto da ORF *SAG2* nos vetores de expressão.

A confirmação da presença e do tamanho do inserto da ORF *SAG2* nos vetores de expressão foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) e digestão enzimática utilizando as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*.

A reação de PCR foi realizada em um volume de 20 μ L, compreendendo: 5 μ L de tampão de amplificação 5x (Phoneutra), 1 μ L de dNTP 10mM (Invitrogen), 1,5 μ L MgCl₂ 25mM (Invitrogen), 0,3 μ L da enzima DNA polimerase Phoneutra, 0,7 μ L *primer forward* e *primer reverse*, ambos SAGs a 100 pMoles/ μ L e água ultrapura q.s.p. 20 μ l. Os ciclos para as reações de amplificação foram padronizados com as seguintes condições: primeira desnaturação a 98°C durante 30 segundos, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 98°C durante 10 segundos; anelamento dos *primers* a 60°C por 30 segundos; extensão a 72°C durante 1 minuto; e extensão final por 2 minutos a 72°C. O produto da PCR foi resolvido em gel de agarose com concentração de 1%, corado com brometo de etídio com concentração final de 0,5 μ g/mL.

A reação de digestão foi realizada conforme descrito no item III. 6.4.2. Logo após, 10 μ L da reação de digestão foram depositados e resolvidos em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio com concentração final de 0,5 μ g/mL.

III.5 Análise da expressão de proteína recombinante *SAG2* por *Corynebacterium pseudotuberculosis* CP13

III.5.1 Cinética da expressão da proteína

Para avaliar a expressão da proteína recombinante *SAG2*, foi realizada uma cinética por um período de 4 horas após a indução com Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), nos plasmídios com promotor indutível. Foi feito um pré-inóculo a partir de um clone positivo de cada linhagem recombinante de *C. pseudotuberculosis*, sendo que 100 μ L da alíquota foram inoculados em 5 mL de meio BHI suplementado com 4,5 μ g/mL de cloranfenicol e incubados sob agitação a 37°C

por 24 horas. Uma alíquota de 1 mL desta cultura foi inoculada em 50 mL de meio BHI e incubada sob as mesmas condições até a cultura atingir uma densidade óptica a 600nm (DO600nm) de 0.5. Após atingir a densidade óptica desejada, foi adicionado 1mM de IPTG à cultura das linhagens com os plasmídeos indutíveis pCXI40 e pCXI45, sendo retiradas alíquotas nos intervalos de 1, 2, 3 e 4 horas após a indução, para a extração proteica.

III.5.2 Extração da proteína

As linhagens foram crescidas e induzidas, quando necessárias, como descrito no item III.2.1, para a extração das proteínas citoplasmáticas e secretadas. Em resumo, microtubos contendo 2 mL das culturas induzidas e não induzidas foram centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante e o precipitado bacteriano foram tratados diferentemente para a precipitação das proteínas.

O precipitado bacteriano foi ressuspensão em 100 µL de uma solução de 10 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 300 mM NaCl; 10 mg/mL Lisozima e 1 mg/mL de antiproteases. A solução foi incubada por 30 minutos no banho Maria a 37°C. Após a incubação, foram acrescentados ao lisado bacteriano 50 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 20% e tampão de carregamento (75 mM tris-HCl pH 6.8, 3% SDS; 15% glicerol; 0,15% azul de bromofenol e 200 mM ditioneitol-DTT) na proporção de 1:1. As amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos e conservadas a -20°C.

Ao sobrenadante foi acrescentado 200µl de ácido tricloroacético (TCA) 100% e 10mM de ditioneitol (DTT), sendo incubado por 1 hora no gelo. As amostras foram centrifugadas a 8000 x g por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão em 60 µL de NaOH 50 mM e tampão de carregamento, na proporção de 1:1. As amostras foram conservadas a 20°C até a utilização.

III.5.3 Resolução eletroforética das proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante SDS-PAGE

As proteínas extraídas, tanto da porção citoplasmática quanto da porção extracitoplasmática, foram resolvidas em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE – “*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*”). Para isto, foi utilizado gel de “separação” na concentração de 18% e o gel de “concentração” a 4%. A eletroforese foi conduzida com voltagem constante de 180 V, 120 mA e 70 W em tampão de corrida Tris-glicina. Aos géis, foram aplicados 3 µL do padrão *Page Ruler Protein Ladder* (Fermentas) e 20 µL das proteínas em tampão de amostra. Na sequência, o gel foi corado com *Coomassie blue* por 30 minutos à temperatura ambiente, seguido de tratamento com o descorante.

III.6 Teste de virulência e persistência das linhagens recombinantes em modelo murino

Para avaliar a virulência e a persistência das linhagens bacterianas no organismo dos animais, os mesmos foram divididos em 8 grupos contendo 6 animais cada. Os grupos se referem aos animais que receberam as linhagens *C. pseudotuberculosis* CP13:pCX535:SAG2, *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXI40:SAG2, *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXI45:SAG2, *C. pseudotuberculosis* CP13 e *C. pseudotuberculosis* T1 como controles positivos e um grupo administrado com solução salina 0,9%, sendo este o controle negativo. Os grupos receberam uma única dose de 100µL com 10⁶ U.F.C. em solução salina 0,9%. A avaliação da virulência foi realizada por meio da observação diária de formação de abscesso no local da inoculação, nível de prostração e número de óbitos, durante o período de 10 dias. A persistência foi avaliada com a utilização desses mesmos grupos, sendo que, nos dias 3, 7 e 10, dois animais por grupo foram eutanasiados e os baços extraídos. Em seguida, os baços foram macerados em solução salina 0,9% para a diluição seriada e semeados em placas de *Petri* contendo BHI, acrescidas dos antibióticos correspondentes e nas concentrações indicadas para cada linhagem recombinante (descritos no item III.5.1), as diluições 10⁰, 10¹ e 10² em duplicatas e realizada a média das colônias recuperadas. O resultado das contagens das

UFC de *C. pseudotuberculosis* recuperadas dos baços dos animais foi analisado com o auxílio do software *GraphPad Prism v.6.0*, utilizando-se o teste *2way ANOVA*.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1 Clonagem da ORF SAG2 nos plasmídeos de expressão

Primeiramente, isolou-se a ORF SAG2 por amplificação, a partir do DNA do plasmídeo pECTACK99-PS-SAG2. Nos pares de iniciadores utilizados (Tabela 3), foram inseridas as sequências dos sítios das enzimas de restrição, *EcoRI* e *HindIII*, para que a clonagem fosse realizada na direção e na fase correta de leitura nos plasmídeos de expressão (Tabela 2).

IV.1.1 Amplificação da ORF SAG2

Na reação de amplificação da ORF SAG2, foi utilizada a enzima DNA polimerase Q5[®] (Invitrogen), uma vez que esta enzima possui grande estabilidade e tem alta especificidade e precisão, sendo ideal para amplificações por PCR que requerem taxas mínimas ou nulas de mutações durante a fase de extensão do DNA.

Observou-se a amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 550 pb, como esperado para a ORF SAG2 recombinante de *T. gondii* (Figura 3). Para evitar amplificação de fragmentos inespecíficos, foi adicionado DMSO com o objetivo de aumentar a especificidade de anelamento dos iniciadores. Foi possível observar na resolução do gel de agarose (1%), corado com brometo de etídio, a ausência de fragmentos inespecíficos. No controle negativo, com adição de água ultrapura estéril, ao invés de DNA plasmidiano, não se observou qualquer produto de amplificação (Figura 3), confirmando a ausência de contaminantes na reação. Amplificada a ORF de interesse SAG2, o próximo passo consistiu na purificação do fragmento de DNA de interesse.

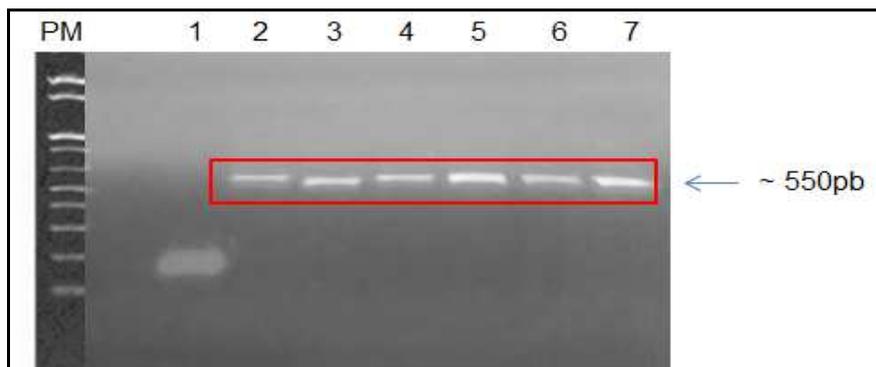


Figura 3 – Análise do produto de amplificação da ORF SAG2 para clonagem nos plasmídeos pCXS35, pCXI40 e pCXI45 a partir do plasmídeo pECTACK99-PS-SAG2. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. PM – Marcador de peso molecular 1Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen); Canaleta 1: Controle negativo da reação; Canaletas 2, 4 e 6: Produto da amplificação referentes à ORF SAG2 para pCXS35; Canaletas 3, 5 e 7: Produto da amplificação referentes à ORF SAG2 para pCXI40 e pCXI45.

IV.1.2 Clonagem e confirmação das clonagem da ORF SAG2 no vetor *Zero Blunt*[®]

Para a obtenção de um alto número de cópias das sequências rSAG2, foram realizadas as clonagens no vetor *Zero Blunt*[®]. Esse plasmídeo foi desenvolvido para clonar fragmentos com extremidades não coesivas, como os fragmentos oriundos dos produtos da PCR. O vetor *Zero Blunt*[®] contém o gene *ccdB* letal de *E. coli*, (BERNARD et al., 1994), fundido com o C-terminal do fragmento *LacZα*. A proteína CCDB é tóxica para a bactéria, pois inibe a DNA girase (topoisomerase II), resultando-se na quebra do DNA e levando a morte celular. Essa é uma estratégia que permite a seleção direta de recombinantes que receberam o inserto ORF SAG2, que se ligando ao vetor interrompe o gene *ccdB*. Portanto, a triagem azul / branco não é necessária e a possibilidade de falso negativo é quase nula. Utilizando essa estratégia obtivemos os vetores pZB:SAG2.

Esses plasmídeos foram transformados em células competentes de *E. coli* TOP10[®] (item III 3.2). A seleção de colônias de *E. coli* TOP10[®] transformadas com esses plasmídeos foi realizada em meio LB ágar contendo 50 µg/mL de canamicina, mantidas em estufa a 37°C. A visualização das colônias foi possível com aproximadamente 18 horas após a transformação. Observaram-se vinte e seis colônias das linhagens correspondente aos plasmídeos que receberam as ORF SAG2 para pCXS35, e trinta e duas colônias da linhagem correspondente aos plasmídeos que receberam as ORF SAG2 para pCXI40 e pCXI45. Foram selecionadas aleatoriamente

duas colônias de cada linhagem transformada resistente ao antibiótico, que em seguida foram então inoculadas em meio líquido seletivo e incubadas a 37°C, por aproximadamente 18 horas sob agitação. Após este período, todos os clones demonstraram crescimento. Estes clones foram estocados em glicerol 40% e mantidos a -80°C para posterior extração dos plasmídeos recombinantes. Nenhuma colônia foi visualizada nas placas do controle negativo, uma vez que nenhum DNA foi adicionado às células durante o processo de transformação. O que indica que não houve qualquer tipo de contaminação durante o processo.

Os DNAs plasmídicos foram extraídos e então utilizados como molde para confirmar a clonagem do inserto de interesse (SAG2) através da técnica de PCR utilizando os iniciadores específicos para a ORF SAG2 de *T. gondii* (Tabela 3). Os clones foram confirmados como sendo portadores do inserto correspondente à ORF SAG2 (550 pb) (figura 4a). Como controle negativo da reação, no qual se utilizou água ultrapura estéril ao invés de DNA molde, não foi observado qualquer sinal de amplificação e o DNA plasmídico pECTACK99-PS-SAG2 (AGUIAR, 2012) foi utilizado como controle positivo da reação (Figura 4a). Além disso, o pZB:SAG2 foi submetido a uma reação de digestão enzimática com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*; o que resultou em dois fragmentos visíveis: um de aproximadamente 550 pb, correspondente à ORF SAG2 e outro fragmento de 3.5Kb, correspondente ao vetor *Zero Blunt*[®] (Figura 4b). Sendo assim, ambos os dados confirmaram a obtenção do plasmídeo pZB:SAG2.

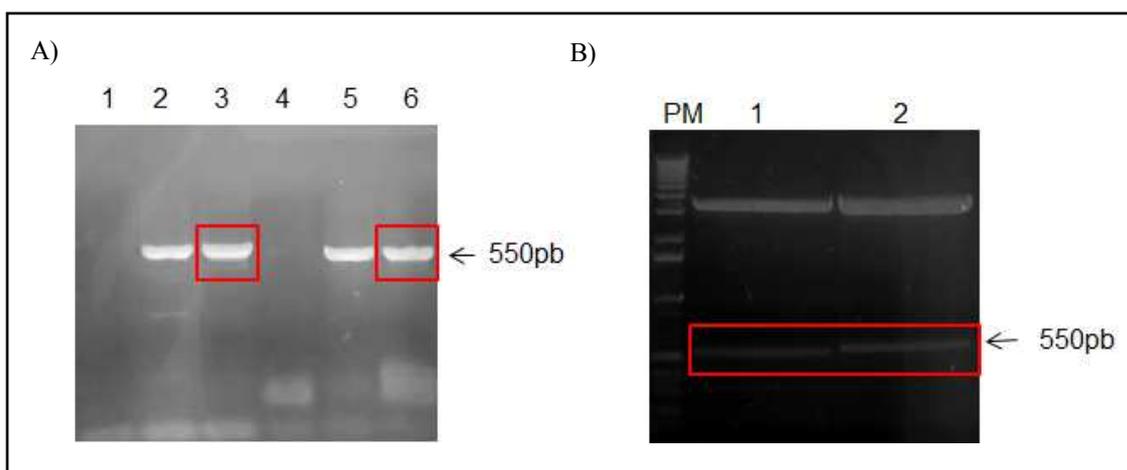


Figura 4 - Amplificação por PCR da ORF SAG2 recombinante de *T. gondii* e digestão enzimática a partir do DNA plasmídico extraído de células de *E. coli* TOP10 transformadas com o plasmídeo pZB:SAG2. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. A) Amplificação da ORF SAG2 por PCR. Canaletas 1 e 4 - Controles negativos; Canaletas 2 e 5 - Controles positivos; Canaletas 3 - ORF SAG2 para pCX535; Canaletas 6 ORF SAG2 para pCX140 e pCX145. B) Digestão enzimática com *EcoRI* e *HindIII*. PM - Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1: ORF SAG2 para pCX535; Canaletas 2: ORF SAG2 para pCX140 e pCX145.

Em seguida, purificou-se o DNA referente às bandas de 550 pb, resultantes da digestão do plasmídeo pZB:SAG2 do gel de agarose (1%). O produto purificado (ORF SAG2) foi utilizado para as clonagens nos plasmídeos de expressão de interesse (Tabela 2) e posteriormente transformado em *E. coli* TOP10[®].

IV.1.3 Clonagem e confirmação das clonagem da ORF SAG2 nos vetores de expressão

Os plasmídeos de expressão pCXS35, pCXI40 e pCXI45 foram desenvolvidos inicialmente objetivando o uso em estudos de engenharia genética, fisiologia e metabolismo de *Corynebacterium glutamicum* (LEE, 2014). O vetor pCXS35 possui o promotor constitutivo do gene *sod* (pSOD) muito utilizado em estudos de engenharia metabólica de *C. glutamicum* (NEUNER & HEINZLE, 2011 *apud* LEE, 2014). Para melhorar a eficiência de iniciação da tradução de proteínas no sistema de vetor de expressão pCXS35, a sequência SD do referido promotor foi modificada com a sequência 5'-GAAAGGAGG-3' (LEE, 2014). No entanto, os outros dois plasmídeos pCXI40 e pCXI45 possuem promotor indutivo. O qual é induzido por IPTG, do gene *ilvC* (*pilvC*). Esse promotor teve uma das atividades mais elevadas de CAT (cloranfenicol-acetiltransferase) em estudos de expressão com *C. glutamicum* (PÁTEK et al., 1996 *apud* LEE, 2014). A diferença básica entre esses dois vetores é que no vetor pCXI45 a sequência de SD foi modificada (5'-GAAAGGAGG-3') visando a otimização da expressão (LEE, 2014).

Os plasmídeos de expressão pCXS35, pCXI40 e pCXI45 foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*. Em seguida a ORF SAG2 com as extremidades coesivas digerido a partir do pZB:SAG2 e purificada foi ligada aos diferentes plasmídeos de expressão citados. Obtendo assim pCXS35:SAG2, pCXI40:SAG2 e pCXI45:SAG2, esquematizados nos mapas das Figuras 5, 6 e 7, respectivamente.

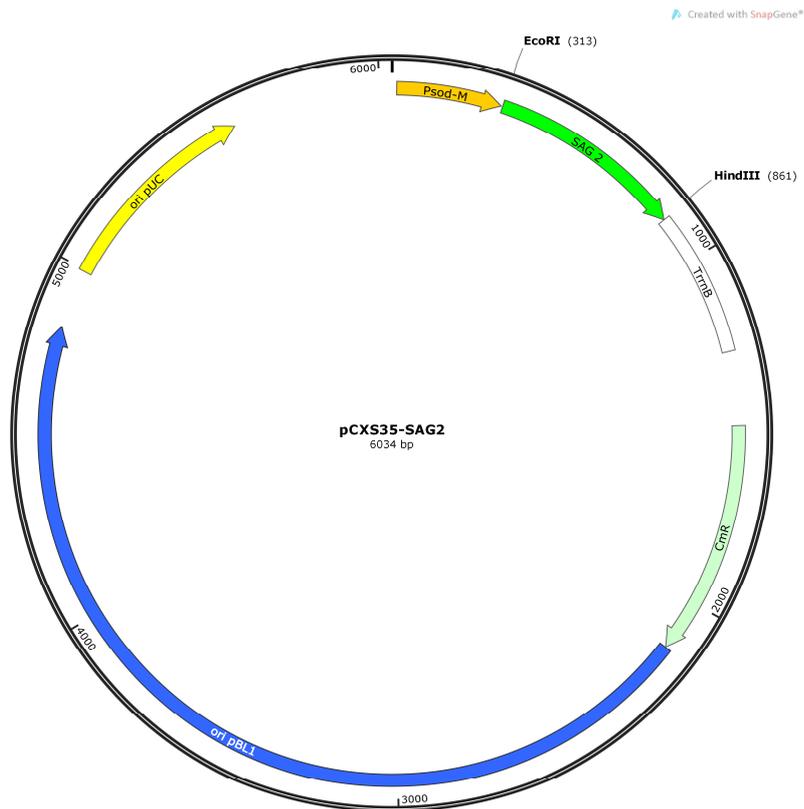


Figura 5 - Representação esquemática do vetor de expressão pCX535:SAG2. Destaque para a localização dos sítios de clivagem das enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*, utilizadas para clonagem da ORF rSAG2 de *T. gondii*.

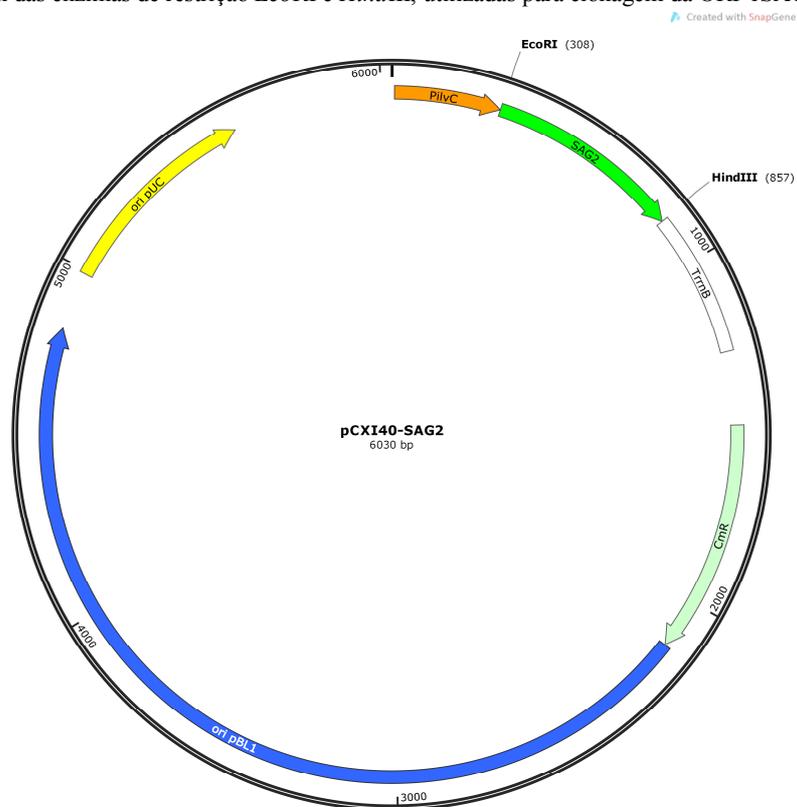


Figura 6 - Representação esquemática do vetor de expressão pCX140:SAG2. Destaque para a localização dos sítios de clivagem das enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*, utilizadas para clonagem da ORF rSAG2 de *T. gondii*.

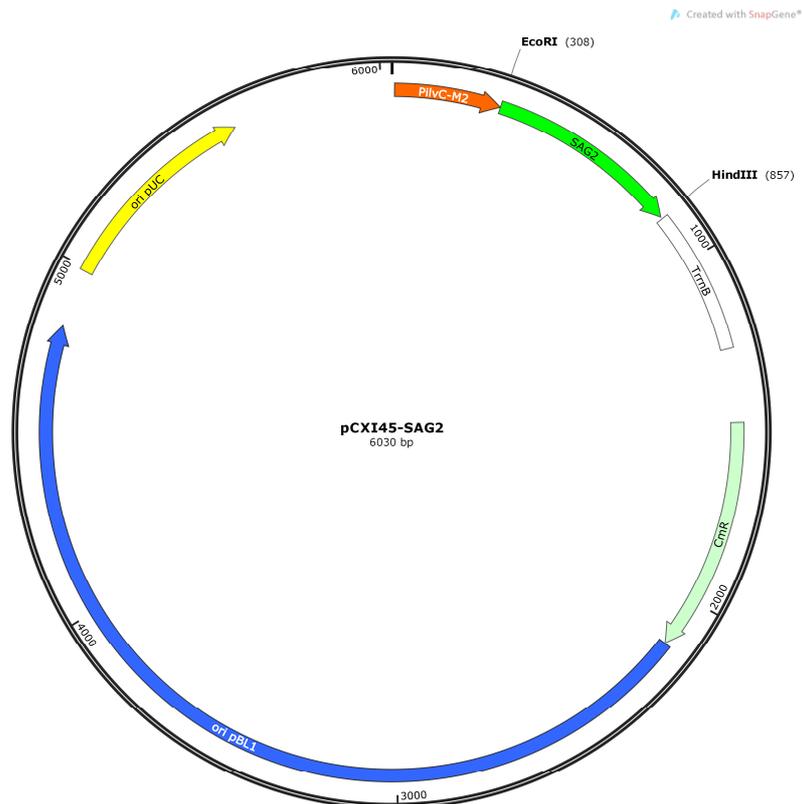


Figura 7 - Representação esquemática do vetor de expressão pCXI45:SAG2. Destaque para a localização dos sítios de clivagem das enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*, utilizadas para clonagem da ORF rSAG2 de *T. gondii*.

Os plasmídeos de expressão, contendo a ORF SAG2, foram transformados em células competentes de *E. coli* TOP10[®]. A seleção de colônias de *E. coli* TOP10[®] transformadas com os referidos plasmídeos foi realizada em meio LB ágar contendo 25 µg/mL de clorafenicol, mantidas a 37°C. A visualização das colônias foi possível com aproximadamente 18 horas após a transformação. Observaram-se doze, dezoito e três colônias das linhagens correspondente aos plasmídeos pCXS35:SAG2, pCXI40:SAG2 e pCXI45:SAG2, respectivamente. Foram selecionadas aleatoriamente, duas colônias de cada linhagem transformada resistente ao antibiótico, que foram então inoculadas em meio líquido seletivo e incubadas a 37°C sob agitação, por aproximadamente 18 horas. Após este período, todos os clones demonstraram crescimento. Estes clones foram estocados em glicerol 40% e mantidos em ultra freezer a -80°C para posterior extração dos DNA plasmidiano. Nenhuma colônia foi visualizada nas placas do controle negativo, uma vez que nenhum DNA foi adicionado às células durante o processo de transformação, o que indica que não houve qualquer tipo de contaminação.

Os DNAs plasmidiano foram extraídos e esses foram utilizados para confirmação dos clones, tanto por PCR, quanto por digestão enzimática (Figuras 8 e 9).

Na confirmação dos clones realizada por PCR com os *primers* específicos para rSAG2 (Tabela 3), observamos a amplificação dos fragmentos na altura esperada de aproximadamente 550 pb, compatível com a ORF SAG2, na resolução do gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio (Figura 8a e 8b).

Os plasmídeos pCXS35:*SAG2*, pCXI40:*SAG2* e pCXI45:*SAG2* também foram submetidos a uma reação de digestão enzimática, utilizando as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*. Após a resolução em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, foi possível identificar as bandas na altura esperada de 550 pb (Figura 9), referentes à liberação do inserto, correspondente à ORF SAG2 e outra banda de 5.5Kb, correspondente aos vetores de expressão (Tabela 2). Sendo assim, os resultados confirmaram a obtenção dos plasmídeos pCXS35:*SAG2*, pCXI40:*SAG2* e pCXI45:*SAG2*.

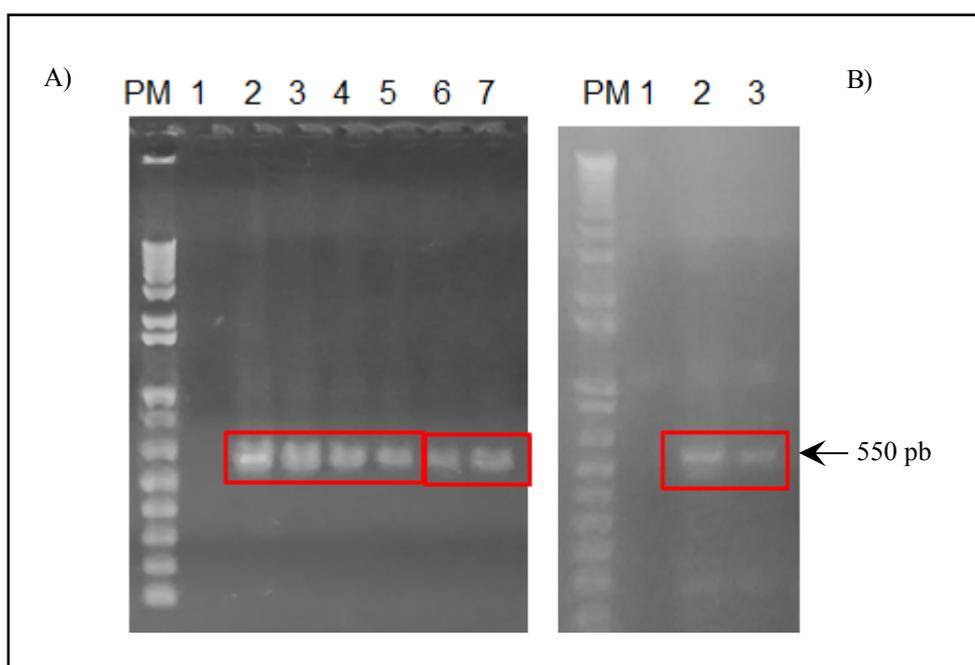


Figura 8 – Amplificação através da técnica de PCR da ORF SAG2 recombinante de *T. gondii* dos DNAs plasmidiano extraídos de *E. coli* TOP10 transformadas com os plasmídeos pCXS35:*SAG2*, pCXI40:*SAG2* e pCXI45:*SAG2* Eletroforese em gel de agarose com concentração de 1% corado com brometo de etídio. **A)** Amplificação da ORF SAG2 a partir dos pCXS35:*SAG2* e pCXI40:*SAG2*. PM: Marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen); Canaleta 1 - Controle negativo; Canaletas 2 a 5 - pCXI40:*SAG2*; Canaletas 6 e 7 - pCXS35:*SAG2*. **B)** Amplificação da ORF SAG2 a partir do pCXI45:*SAG2*. PM: Marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen); Canaleta 1: Controle negativo; Canaletas 2 e 3 pCXI45:*SAG2*.

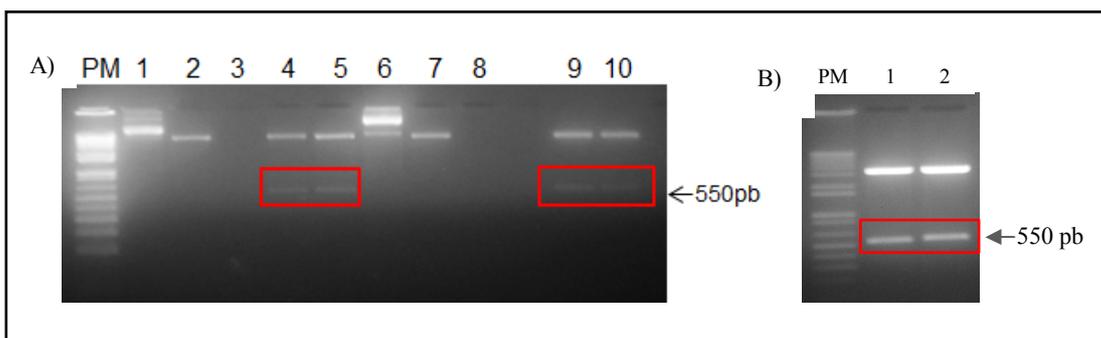


Figura 9 – Digestão enzimática dos DNAs plasmidiano extraídos de *E. coli* TOP10 transformadas com os plasmídeos pCXS35:SAG2 e pCXI40:SAG2 e pCXI45:SAG2 Eletroforese em gel de agarose com concentração de 1% corado com brometo de etídio. **A)** Amplificação da ORF SAG2 a partir dos pCXS35:SAG2 e pCXI40:SAG2. PM: Marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen). Canaletas 1 e 6: plasmídeos fechados, Canaletas 2 e 7: plasmídeos lineares, Canaletas 3 e 8: controles negativos e Canaletas 4, 5, 9 e 10 digestões dos plasmídeos pCXS35:SAG2 e pCXI40:SAG2, respectivamente. **B)** Amplificação da ORF SAG2 a partir do pCXI45:SAG2. PM: Marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen). Canaletas 1 e 2: digestão do plasmídeo pCXI45:SAG2.

A escolha desses vetores como sistemas de expressão para ser utilizado em *C. pseudotuberculosis* foi devido a vários fatores. O primeiro se deve ao fato de que esses vetores foram desenvolvidos para serem utilizados em *C. glutamicum* que é uma espécie filogeneticamente próxima de *C. pseudotuberculosis* pertencentes ao mesmo gênero *Corynebacterium*. O que sugere que as chances de funcionarem adequadamente em *C. pseudotuberculosis* são altas. Segundo fator de escolha foi devido a que todos os vetores selecionados possuem promotores que são conhecidos por funcionarem muito bem em *C. glutamicum*. Esses plasmídeos já foram caracterizados quanto a capacidade de cada promotor, nos níveis de transcrição e tradução por análises de qRT-PCR, fluorescência GFP e SDS-PAGE, apresentando bons resultados (LEE, 2014). Todos os vetores de expressão podem ser utilizados para expressão heteróloga tanto em *C. glutamicum* quanto em *E. coli*, o que facilita a clonagem eficiente e a caracterização de genes e proteínas de interesse em *E. coli*, num primeiro momento, e em seguida, aplicar engenharia metabólica de *C. pseudotuberculosis* sem a necessidade de manipulações genéticas adicionais. Além disso, estes vetores de expressão tem sítios múltiplos de clonagem que facilita a manipulação para clonar e expressar convenientemente muitos genes alvo em *C. pseudotuberculosis*.

IV.4 Obtenção das linhagens *C. pseudotuberculosis* CP13 carreando os diferentes vetores de expressão

Os mesmos plasmídeos de expressão confirmados, tanto por PCR quanto por digestão (Item IV.1.3), transformados em *E. coli* TOP10[®], foram transformados na linhagem de *C. pseudotuberculosis* CP13. A seleção de colônias de *C. pseudotuberculosis* transformadas com esses plasmídeos foi realizada em meio BHI ágar contendo 4,5 µg/mL de clorafenicol. A visualização das colônias foi possível em aproximadamente 72 horas após a transformação. Foram observadas duas colônias da linhagem *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXS35:SAG2, quatro colônias da linhagem *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXI40:SAG2 e duas colônias da linhagem *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXI45:SAG2. Nenhuma colônia foi visualizada nas placas do controle negativo, onde nenhum DNA foi adicionado às células durante o processo de transformação, indicando ausência de contaminação. Todas as colônias foram então inoculadas em meio líquido seletivo e mantidas a 37°C por aproximadamente 72 horas sob agitação. Após este período, todos os clones demonstraram crescimento. As culturas contendo as linhagens de *C. pseudotuberculosis* CP13 recombinantes, por sua vez, foram estocadas em glicerol 80% (1:3) e, em seguida, realizou-se a extração do DNA plasmidiano. Estes DNAs plasmidiano foram utilizados para as confirmações das clonagens, por meio das técnicas de PCR e digestão enzimática com as enzimas correspondentes.

Na confirmação dos clones, realizada por PCR, com os *primers* específicos para rSAG2 (Tabela 3), observamos a amplificação dos fragmentos na altura esperada de aproximadamente 550 pb, compatível com a ORF SAG2 (Figura 10a e 10b). Na resolução em gel de agarose, corado com brometo de etídio, houve a amplificação de uma banda inespecífica no clone 2 referente à linhagem de *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXS35:SAG2, desta forma o clone 1 foi o selecionado para prosseguir no estudo.

Os plasmídeos pCXS35:SAG2, pCXI40:SAG2 e pCXI45:SAG2 também foram submetidos a uma reação de digestão enzimática, utilizado as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*. Após a resolução em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, foi possível identificar as bandas na altura esperada de 550 pb (Figura 10c), referentes à liberação do inserto, correspondente à ORF SAG2 e outra banda de 5.5Kb, correspondente aos vetores de expressão (Figura 10c). Sendo assim, os resultados

confirmaram a obtenção das linhagens *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXS35:SAG2, *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXI40:SAG2 e *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXI45:SAG2.

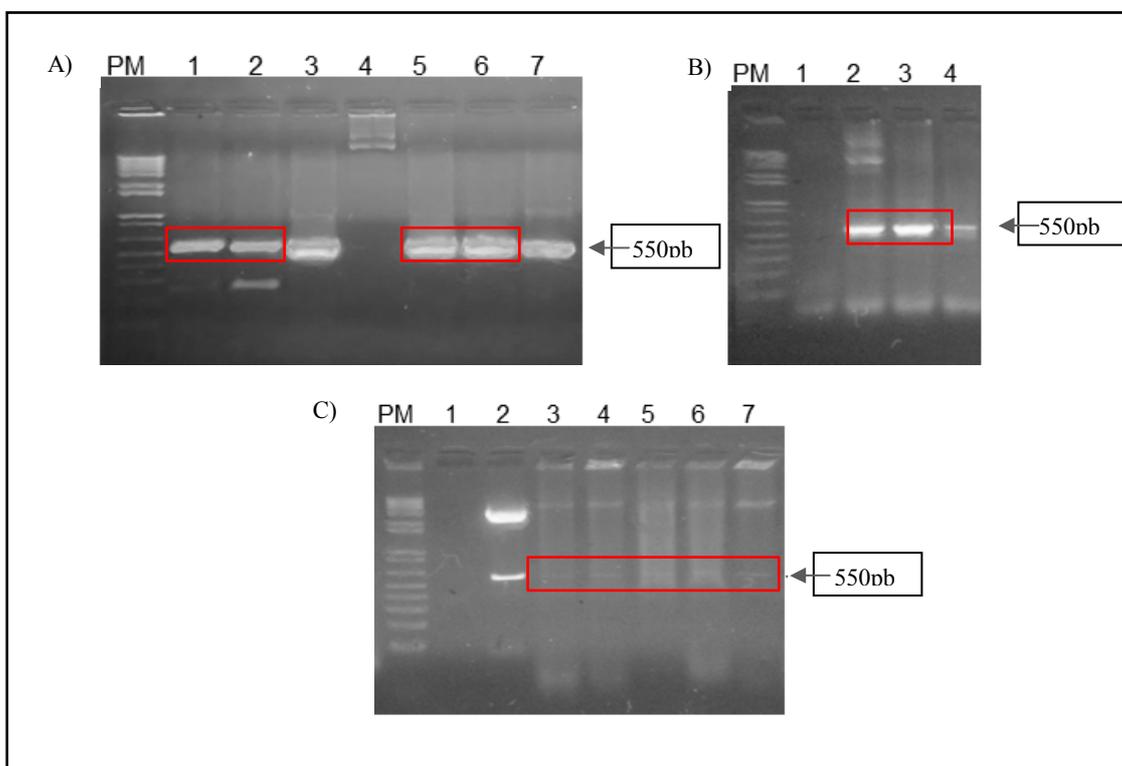


Figura 10 – Amplificação por PCR e Digestão enzimática dos DNAs plasmídicos extraídos de *C. pseudotuberculosis* CP13 transformadas com os plasmídeos pCXS35:SAG2, pCXI40:SAG2 e pCXI45:SAG2. Eletroforese em gel de agarose com concentração de 1% corado com brometo de etídio. **A)** Amplificação por PCR da ORF SAG2 a partir dos pCXS35:SAG2 e pCXI40:SAG2. Canaletas 1 e 2: pCXS35:SAG2, Canaletas 3 e 7: Controles positivos; Canaleta 4: Controle negativo; Canaleta 5 e 6: pCXI45:SAG2 **B)** Amplificação por PCR da ORF SAG2 a partir do pCXI45:SAG2. Canaletas: Controle negativo; Canaletas 2 e 3: pCXI45:SAG2; Canaleta 4: Controle positivo. **C)** Digestão enzimática com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*. Canaleta 1: Controle negativo. Canaleta 2: Controle positivo; Canaleta 3: pCXS35:SAG2; Canaletas 4 e 5: pCXI40:SAG2; Canaletas 6 e 7: pCXI45:SAG2. PM: Marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Observou-se que as linhagens de *C. pseudotuberculosis* CP13 submetidas a transformação contendo a ORF rSAG2 tiveram um retardo no crescimento quando comparado com a linhagem não transformante *C. pseudotuberculosis* CP13 (dados não demonstrados). Será necessário realizar mais análises nesse aspecto, mas supõe que o plasmídeo acarretou um aumento na carga metabólica da bactéria o que levou a essa modificação na característica fenotípica em relação à linhagem parental. É necessário também, avaliar se a inserção dos plasmídeos pode ter dado instabilidade à bactéria, acarretando em crescimento um pouco mais lento.

IV.5 Análise da expressão da proteína recombinante SAG2 por *Corynebacterium pseudotuberculosis* CP13

Uma vez obtidas e confirmadas as linhagens recombinantes de *C. pseudotuberculosis* CP13, seguiu-se para a avaliação da capacidade de expressão da proteína rSAG2. Para essa avaliação, utilizou-se o extrato bacteriano, a partir do qual foi realizada uma cinética de quatro horas após a indução por IPTG para as linhagens *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXI40:SAG2 e *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXI45:SAG2, para extração das proteínas citoplasmáticas e secretadas. A linhagem *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXS35:SAG2, com o promotor constitutivo, seguiu a mesma cinética sem a indução por IPTG. Para tanto, as alíquotas proteicas extraídas das culturas induzidas e não induzidas com os respectivos plasmídeos foram analisadas em gel de poliacrilamida (item III.5.3). Este procedimento se deu por meio de análises por SDS-PAGE, utilizando-se o método de coloração por *Coomassie blue* para a visualização das proteínas totais no gel.

Com relação à linhagem recombinante de *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXS35:SAG2, não foi possível a visualização de nenhuma diferença do padrão proteico na altura do peso molecular esperado de 22 KDa correspondente a rSAG2, das proteínas extraídas tanto na porção citoplasmática, quanto na porção secretada, quando comparado ao controle (Figura 11 e 12).

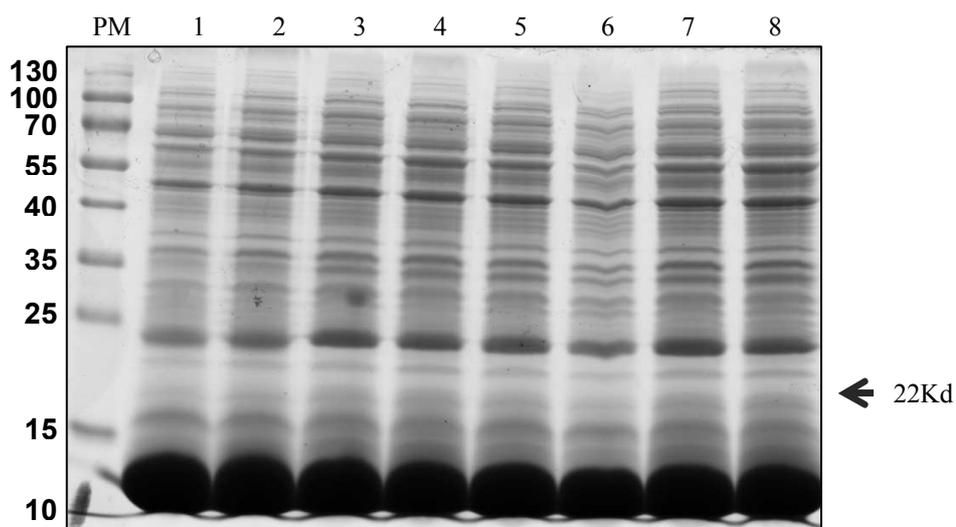


Figura 11 – SDS-PAGE realizado a partir do extrato total das proteínas citoplasmático de cultura bacteriana da linhagem *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXS35:SAG2. Canaleta 1: *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific); Canaletas 2 a 4: linhagem de *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXS35 avaliação da expressão nos tempos 1, 2, 3 e 4 horas, respectivamente. Canaletas 5 a 8: *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXS35:SAG2 avaliação da expressão nos tempos 1, 2, 3 e 4 horas, respectivamente. A resolução foi realizada em gel de poliacrilamida desnaturante com concentração de 18%, corado por *coomassie blue*.

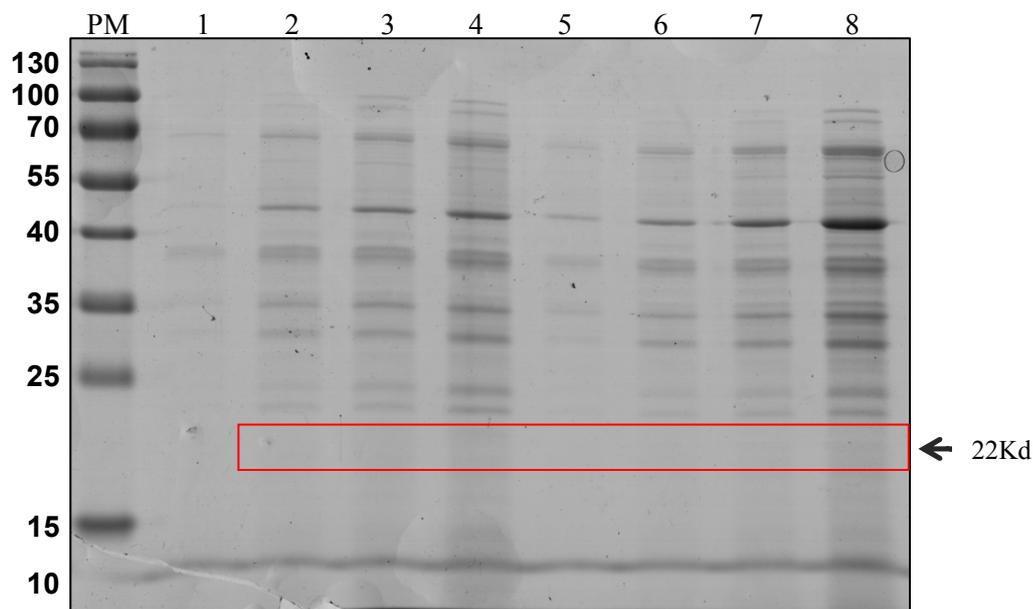


Figura 12 - SDS-PAGE realizado a partir do extrato total das proteínas secretadas de cultura bacteriana da linhagem *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXS35:SAG2 Canaleta 1: *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific); Canaletas 2 a 4: linhagem de *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXS35 avaliação da expressão nos tempos 1, 2, 3 e 4 horas, respectivamente. Canaletas 5 a 8: *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXS35:SAG2 avaliação da expressão nos tempos 1, 2, 3 e 4 horas, respectivamente. A resolução foi realizada em gel de poliacrilamida desnaturante com concentração de 18%, corado por *coomassie blue*.

O mesmo foi observado com relação às linhagens recombinantes de *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXI40:SAG2 e *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXI45:SAG2, ambas com promotores indutíveis por IPTG. Não foi possível visualizar diferença, por SDS-PAGE, no padrão proteico total extraído das culturas induzidas por IPTG e não induzidas, tanto na porção citoplasmática quanto na porção secretada. O padrão proteico total extraído das linhagens *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXI40:SAG2 (Figura 13 e 14) e *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXI45:SAG2 (não representado) apresentaram o mesmo perfil de bandas proteicas.

Este resultado foi inesperado, pois no trabalho de Aguiar (2012) foi verificado indício de que a *C. pseudotuberculosis* T1 é capaz de expressar o antígeno rSAG2. Assim, faz-se necessária maior investigação, podendo, por exemplo, aumentar o tempo de expressão para análise e também utilizar técnicas mais específicas e sensíveis para detecção de proteínas como a técnica de *Western Blotting*.

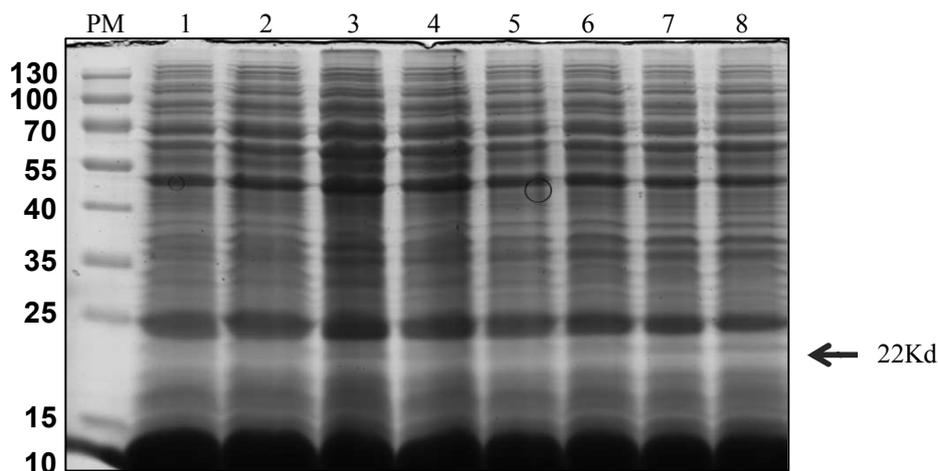


Figura 13 - SDS-PAGE realizado a partir do extrato total das proteínas citoplasmáticas de cultura bacteriana da linhagem *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXI40:SAG2. PM - *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific); Canaletas 2 a 4: culturas sem indução com IPTG - Cp13 40 sag2 (1h), Cp13 40 sag2 (2h), Cp13 40 sag2 (3h), Cp13 40 sag2 (4h), respectivamente; Canaletas 5 a 8 culturas induzidas com IPTG - Cp13 40 sag2 (1h), Cp13 40 sag2 (2h), Cp13 40 sag2 (3h) e Cp13 40 sag2 (4h), respectivamente. A resolução foi realizada em gel de poliacrilamida desnaturante com concentração de 18%, corado por *coomassie blue*.

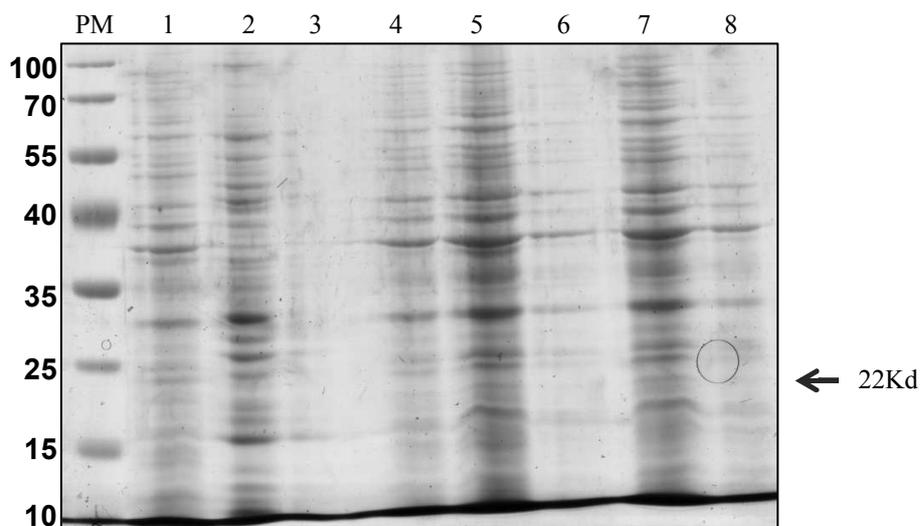


Figura 14 - SDS-PAGE realizado a partir do extrato total das proteínas secretadas de cultura bacteriana da linhagem *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXI45:SAG2. PM - *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific); Canaletas 2 a 4: culturas sem indução com IPTG - Cp13 40 sag2 (1h), Cp13 40 sag2 (2h), Cp13 40 sag2 (3h), Cp13 40 sag2 (4h), respectivamente; Canaletas 5 a 8 culturas induzidas com IPTG - Cp13 40 sag2 (1h), Cp13 40 sag2 (2h), Cp13 40 sag2 (3h) e Cp13 40 sag2 (4h), respectivamente. A resolução foi realizada em gel de poliacrilamida desnaturante com concentração de 18%.

Estes resultados não corroboram com os testes realizados por Lee (2014) após as construções dos vetores (Tabela 2) utilizados neste trabalho, a fim de avaliar a força do promotor em relação ao nível de transcrição de mRNA do gene GFP por *C. glutamicum*, que foi medido por qRT-PCR. Entretanto, não ter detectado expressão da proteína rSAG2 nas linhagens que receberam, principalmente, os plasmídeos com o promotor *P_{ilvC}* foi inesperado, pois os relatos na literatura o consideram um promotor forte em *C. glutamicum* (LEE, 2014), e esperava um resultado parecido em *C. pseudotuberculosis*.

Algumas linhagens *C. pseudotuberculosis* vem sendo testadas quanto ao seu potencial como vetor de expressão de proteínas heterólogas com finalidade vacinal. Moore e cols. (1999) utilizando uma linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o gene da *pld* (*Toxminus*) testou o seu potencial como vetor vivo para expressar e apresentar vários antígenos vacinas para ovelhas. E observaram que a *C. pseudotuberculosis*, tanto com vetores de expressão indutíveis quanto constitutivos, tiveram diferentes graus de expressão dos vários antígenos testados. A maior diferença de expressão observada está relacionada ao tipo de antígeno, pois alguns antígenos com baixa expressão foi sugestiva de toxicidade para a bactéria (LEE, 2014). Enquanto que outros antígenos foram expressos em níveis altos o suficiente para serem detectáveis por meio de SDS-PAGE.

Um estudo realizado por Aguiar (2012), utilizou a linhagem *C. pseudotuberculosis* T1 (que é a linhagem selvagem parental de *C. pseudotuberculosis* CP13) como vetor de expressão para a proteína rSAG2, utilizando um plasmídeo com promotor induzido por IPTG. Observou que a *C. pseudotuberculosis* foi capaz de expressar a proteína rSAG2. Nos testes realizados em camundongos BALB/c infectados com *C. pseudotuberculosis* T1:SAG2, foi detectada a produção de anticorpos específicos para a proteína recombinante secretada pela bactéria. Sendo assim, este resultado reforça que a espécie *C. pseudotuberculosis* é potencialmente um vetor de expressão para proteínas heterólogas, com utilização em formulações vacinais.

Moore e cols. (1999) destacam que para aperfeiçoar a expressão é importante a escolha da melhor estratégia de expressão para cada antígeno. Dessa forma é uma vantagem quando o vetor bacteriano apresenta capacidade de expressão em ambas as formas, secretada e citoplasmática, e essa capacidade foi observada nos estudos com a *C. pseudotuberculosis* (MOORE et al., 1999).

Existem alguns estudos utilizando bactérias como vetores de expressão heteróloga no qual as proteínas não foram detectadas pelas técnicas *in vitro* utilizadas.

Todavia esses vetores foram capazes de estimular uma resposta imune humoral com altos níveis de produção de anticorpos específicos e protegeram os animais desafiados (CHATFIELD et al., 1992). Apesar da importância da detecção da expressão da proteína e da verificação da modulação da resposta imune humoral, a leitura mais importante de um potencial vacinal é sua eficácia protetora demonstrada *in vivo* (MOORE et al., 1999).

Além da expressão da proteína, quando se refere a desenvolvimento de vacinas, existem outros aspectos importantes citados na literatura no que se refere a sistemas de vetores bacterianos vivos potencialmente vetores vacinais. É preciso considerar que a forma de expressão e forma de apresentação do antígeno interfere na modulação da resposta imune do hospedeiro (HESS et al., 1996; LANGENNANN et al., 1994, *apud* MOORE et al., 1999).

IV.6 Avaliação da virulência e persistência das linhagens recombinantes *C. pseudotuberculosis* CP13

Com o intuito de avaliar se a inserção do plasmídeo de expressão contendo a ORF SAG2 interferiu no perfil de virulência das linhagens mutantes, foram realizados ensaios de infecção utilizando camundongos BALB/c. Os trinta e seis animais foram divididos em seis grupos e observados, diariamente, quanto à formação de abscessos no local da aplicação, nível de prostração e o número de óbitos. Não houve óbitos durante o período de observação. A análise do exame físico geral dos animais infectados com as linhagens selvagem e mutante de *C. pseudotuberculosis* (Tabela 1), não mostrou nenhuma diferença entre os grupos infectados e o controle negativo. Diferente do que foi observado por Aguiar (2012) em um estudo realizado com a bactéria *C. pseudotuberculosis* T1, contendo um vetor de expressão com a ORF SAG2, em que foi avaliada a virulência por meio da infecção de camundongos BALB/c nas mesmas condições do presente trabalho. Esse trabalho mostrou que os animais infectados com a linhagem mutante *C. pseudotuberculosis* CpT1:SAG2 apresentaram uma grande prostração e perda de peso em relação à linhagem selvagem parental (Comunicação pessoal). Esse é um resultado esperado, pois já se sabe que a linhagem *C. pseudotuberculosis* CP13 utilizado no trabalho atual, tem um perfil de virulência

atenuado quando comparado com a linhagem *C. pseudotuberculosis* T1 (DORELLA, 2009).

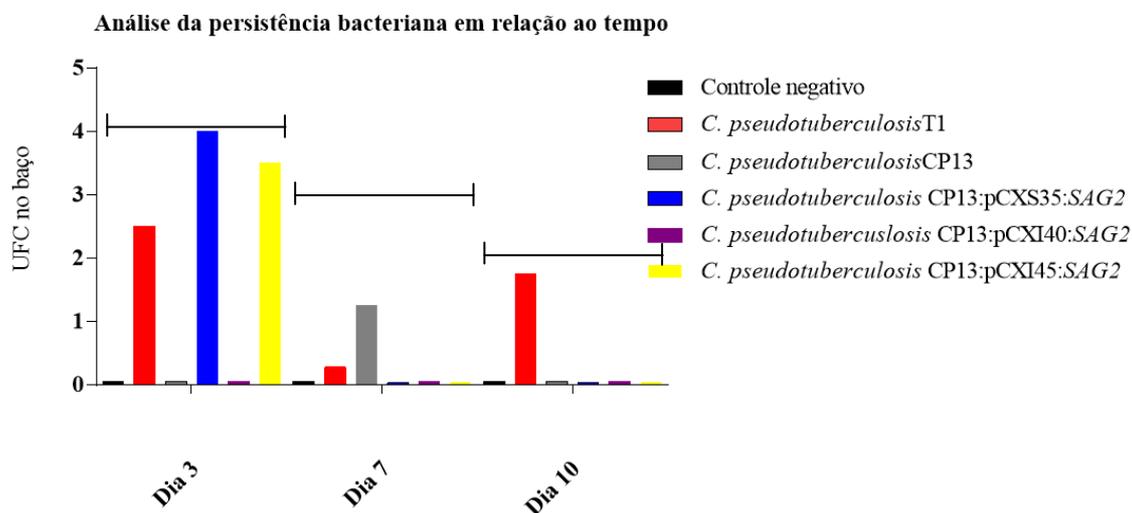


Figura15 - Unidades formadoras de colônia presentes no baço dos camundongos BALB/c nos dias 3, 7 e 10 após a infecção com as respectivas linhagens. Teste 2way ANOVA $p < 0,05$.

O gráfico ilustrado na figura 15 representa os resultados obtidos sobre a avaliação do potencial de colonização e a persistência no baço dos animais infectados com as linhagens recombinantes e os controles. Observou-se que todas as linhagens testadas foram recuperadas no 3º dia. A partir do 7º dia de infecção a recuperação foi somente das linhagens controles *C. pseudotuberculosis* T1 e *C. pseudotuberculosis* CP13. A baixa persistência observada indica que essas linhagens não são capazes de persistirem no organismo dos animais sugerindo a sua incapacidade de desenvolver a patologia. Essa característica prediz segurança quanto à utilização como vetor de expressão de proteínas heterólogas para formulações vacinais. A incapacidade de permanecer no organismo após a fase aguda impossibilita o desenvolvimento de LC, que é uma doença crônica, ao contrário do que foi observado no controle positivo *C. pseudotuberculosis* T1 (linhagem selvagem parental) que persistiu até o último dia da coleta.

De maneira similar foi realizado um estudo com um mutante de *Legionella pneumophila* sobre a capacidade de persistir no pulmão e relacionar com o

desenvolvimento de doenças pulmonares. Este estudo mostrou que a linhagem mutante cresceu normalmente em culturas de células, mas teve a capacidade de recuperação bacteriana reduzida no organismo (DEBROY et al., 2006), e conseqüentemente não foi capaz de desenvolver a doença. Vários são os fatores estudados buscando a elucidação, tanto referente às estratégias utilizadas pelas bactérias, quanto pelo sistema imune do hospedeiro, de como a persistência de agentes patogênicos estão implicados nas lesões inflamatórias e subseqüentes infecções crônicas.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que houve uma redução na capacidade de sobrevivência das linhagens recombinantes no hospedeiro em relação à linhagem selvagem *C. pseudotuberculosis* T1. Possivelmente, essa redução foi capaz de afetar a virulência dessas linhagens, uma vez que os ensaios *in vivo* demonstraram que a inserção dos plasmídeos afetou o potencial das novas linhagens recombinantes de *C. pseudotuberculosis* CP13 em causar lesão e morte nos camundongos, e a capacidade de colonização no baço dos animais infectados. Tal fato também foi observado por Ribeiro e cols. (2014) no trabalho realizado com a bactéria *C. pseudotuberculosis* CP13. Esse trabalho demonstrou que, apesar da bactéria ser patogênica após a mutação houve atenuação da mesma, tornando a segura e, ao mesmo tempo, capaz de estimular o sistema imune e assim, gerar proteção em torno de 80% nos ensaios após desafio com a linhagem virulenta (RIBERIO et al., 2014). Por tanto, será necessário dar continuidade aos ensaios de imunização seguidos de desafio. Estes ensaios são importantes para avaliação da permanência da proteção dessas novas construções com linhagem recombinantes de *C. pseudotuberculosis* CP13 contra linfadenite caseosa.

Apesar de não ter observado a expressão da proteína rSAG2 pelas linhagens *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXS35:SAG2, *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXI40:SAG2 e *C. pseudotuberculosis* CP13:pCXI45:SAG2, não pode desconsiderar que *C. pseudotuberculosis* tem um grande potencial como vetor de expressão de proteínas heterólogas. Vários são os questionamentos que precisam ser elucidados quanto a essa expectativa e necessitam de mais investigação. Faz se necessários também realizar estudos para avaliar a modulação da resposta imune e a proteção *in vivo*, após desafios com linhagens virulentas. Alguns fatores como a escolha do promotor, local de expressão da proteína, modelo animal e vias de administração da vacina, favorecem para a eficiência da imunização. Estratégias que deve ser empregadas futuramente a fim de dar continuidade à avaliação da utilização da *Corynebacterium pseudotuberculosis* como vetor de expressão de proteínas heterólogas sendo capaz de gerar proteção contra

infecções por *C. pseudotuberculosis* e *T. gondii*. O presente estudo apresentou resultados preliminares, e a possibilidade das linhagens bacterianas serem testados como vacina bivalente não deve ser descartada.

V. CONCLUSÃO

Nas condições do presente trabalho, foi possível concluir que:

- As construções das linhagens recombinantes *C. pseudotuberculosis* CP13 pCXS35:SAG2, *C. pseudotuberculosis* CP13 pCXI40:SAG2 e *C. pseudotuberculosis* CP13 pCXI45:SAG2 foram realizadas com sucesso, confirmadas pelas técnicas de PCR e por digestão enzimática.
- O resultado obtido com as construções sugere que mais estudos são necessários para a avaliação da capacidade da utilização das três linhagens recombinantes de *C. pseudotuberculosis* CP13 como vetores de expressão da proteína recombinante SAG2.
- A atenuação e a redução da persistência das linhagens recombinantes possibilitam a utilização deste microrganismo, originalmente patogênico, como grande potencial para utilização como vacinas vivas atenuadas.

VI. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste estudo abrem as seguintes perspectivas:

- Avaliação da capacidade das linhagens recombinantes de *C. pseudotuberculosis* CP13 em expressar a rSAG2, com a utilização de diferentes protocolos, considerando-se, principalmente, maior tempo de expressão e também técnicas mais sensíveis para detecção de proteínas.
- Realização de ensaios *in vitro* e *in vivo*, com o intuito de investigar a modulação da resposta imune estimulada pelas linhagens recombinantes de *C. pseudotuberculosis* CP13, contendo os plasmídeos de expressão clonados com a ORF SAG2.

REFERÊNCIAS

ABDEL-FATTAH AF, MAHMOUD DA, ESAWY MA. **Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymic synthesis of levan and Fructo-Oligosaccharides.** Curr Microbiol. 2005 Dec;51(6):402-7. Epub 2005 Nov 16. PubMed PMID: 16328628.

AGUIAR, M. C. A. M. 2012. **Desenvolvimento de um modelo de vacinação contra *Toxoplasma gondii* utilizando *Corynebacterium pseudotuberculosis* atenuadas recombinantes como veículo para a apresentação de antígenos.** Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. Dissertação mestrado). 82p.

ALVES, CJ, VASCONCELLOS, SA, NAVARRO, IT, *et al.* (1997). **Avaliação dos níveis de aglutinina anti-Toxoplasma em soros de caprinos de cinco centros de criação no nordeste do Brasil.** Revista Brasileira de Ciência Veterinária. 14, 75-77.

ALVES, FSF, PINHEIRO, RR. (1997). **Linfadenite caseosa – Recomendações e Medidas Profiláticas.** Embrapa – comunicado técnico. 33, 1-4.

ANDERSON SE Jr, BAUTISTA SC, REMINGTON JS. **Specific antibody-dependent killing of *Toxoplasma gondii* by normal macrophages.** Clin Exp Immunol. 1976 Dec;26(3):375-80. PubMed PMID: 1009680; PubMed Central PMCID: PMC1540976.

ARAMINE, JJ, STEPHEN, C, DUBEY, JP, *et al.* 1999). **Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts.** Epidemiology and infection. 122, 305-315.

ARSENAULT J, GIRARD C, DUBREUIL P, *et al.* **Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada.** Prev Vet Med. 2003 May 30;59(1-2):67-81. PubMed PMID: 12719018.

AUBERT, D., MAINE. G.T.,VILLENA, I.,*et al.*, **Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii* – specific Immunoglobulin G and Immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay.** Jorunal of Clinical Microbiology, 38(3): 1144-1155.2000 bacterial persistence in the lung. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Dec 12;103(50):19146-51. Epub 2006 Dec 5. PubMed PMID: 17148602; PubMed Central

BAIRD, GJ, E FONTAINE, MC 2007. ***Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis.** J. Comp. Pathol. 137, 179-210.

BARIONI, G, TESOLINE, P, BELTRAME, MAV, *et al.* 2009. **Soroprevalência da toxoplasmose em ovinos da raça santa Inês nos municípios da Grande Vitória - ES.** Ciência Animal Brasileira – Suplemento 1 – Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria

BERNARD, P., GABANT, P., BAHASSI, E. M., AND COUTURIER, M. (1994). **Positive Selection Vectors Using the F Plasmid ccdB Killer Gene.** Gene 148, 71-74.

BIEMANS, R, GREGOIRE, D, HAUMONT, M, *et al.* 1998). **The conformation of purified *Toxoplasma gondii* SAG1 antigen, secreted from engineered *Pichia pastoris*, is adequate for serorecognition and cell proliferation.** J Biotechnol 66, 137-146.

BILLINGTON SJ, ESMAY PA, SONGER JG, JOST BH. **Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*.** FEMS Microbiol Lett. 2002 Feb 19;208(1):41-5. PubMed PMID:11934492.

BRUÑA-ROMERO, O, OLIVEIRA, DM, ANDRADE-NETO, VF. 2012 **Toxoplasmosis: Advances and Vaccine Perspectives.** Current Topics in Tropical Medicine. Alfonso J. Rodriguez-Morales Ed.I, ISBN: 978-953-51-0274-8.

BURNS E, BACHRACH G, SHAPIRA L, NUSSBAUM G. CUTTING EDGE: **TLR2 is required for the innate response to *Porphyromonas gingivalis*: activation leads to bacterial persistence and TLR2 deficiency attenuates induced alveolar bone resorption.** J Immunol. 2006 Dec 15;177(12):8296-300. PubMed PMID: 17142724.

BUXTON, D, INNES, EA. **A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis.** Parasitology. 110, S11-16, 1995

BUXTON, D., PATH, F.R.C., WHRIGHT, S. *et al* **Decoquinatate and the control of experimental ovine toxoplasmosis.** The Veterinary Record, v.138, n.18, 434-436, 1996.

BUXTON, D., RODGER, S.M., MALEY, S.W. *et al.* **Toxoplasmosis:** The possibility of vertical transmission. Small Ruminant Research, v.62, p.42-46, 2006

CAETANO, BRAULIA COSTA. 2005. **Desenvolvimento de um modelo de vacinação contra *Toxoplasma gondii* empregando adenovírus recombinante.** Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais. Tese de Doutorado. 105 p.

CAETANO, BC, BRUÑA-ROMERO, O, FUX, B, *et al.*. **Vaccination with replication- deficient recombinant adenovirus encoding the main surface antigens of *Toxoplasma gondii* induces immune response and protection against Infection in Mice.** Human Gene Therapy, 17, 415-426, 2006

CARNEIRO A.C.A.V. 2006. **Soroepidemiologia da toxoplasmose caprina e ovina no Estado de Minas Gerais.** Dissertação de Mestrado em Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 116p.

CASCIOTTI L, ELY KH, WILLIAMS ME, *et al.* **CD8(+)-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* can be induced but not maintained in mice lacking conventional CD4(+) T cells.** Infect Immun. 2002 Feb;70 (2):434-43.

CAVALCANTE A.C.R. 2004. **Epidemiologia e caracterização de *Toxoplasma gondii* (Nicolle et Manceaux, 1909) em Caprinos no Ceará.** Tese de Doutorado em Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 145 p.

CESBRON-DELAUW, MF, TOMAVO, S, BEAUCHAMPS, P, *et al.* 1994. **Similarities between the primary structures of two distinct major surface proteins of *Toxoplasma gondii***. The Journal of Biological Chemistry. 269, 16217-16222.

CHAPLIN PJ, DE ROSE R, BOYLE JS, *et al.* **Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep**. Infect Immun. 1999 Dec;67(12):6434-8.

CHATFIELD, S.N., CHARLES, I.G., MAKOFF, A.J. *et al.* **Use of the nirB promoter to direct the stable expression of heterologous antigens in *Salmonella* oral vaccine strains: development of a single-dose oral tetanus vaccine** Biotechnology, 10 (1992), pp. 888–892

COLLETT, M.G.; BATH, G.F.; CAMERO, C.M. ***Corynebacterium pseudotuberculosis* infections**, in: COLLETT M.G., BATH G.F., CAMERON C.M. (EDS.), *Infections diseases of livestock with special reference to Southern Africa*, Oxford University Press, v. 2, p. 1387-1395, 1994.

COSTA, M. P.; 2011. **Caracterização molecular do gene *phoP* de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e avaliação do potencial vacinal da linhagem PhoP mutante**. Fortaleza: Universidade Estadual do Ceara. Tese de Doutorado. 270p.

DEBROY S, DAO J, SÖDERBERG M, ROSSIER O, CIANCIOTTO NP. ***Legionella pneumophila* type II secretome reveals unique exoproteins and a chitinase that promotes bacterial persistence in the lung**. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Dec 12;103(50):19146-51. Epub 2006 Dec 5. PubMed PMID: 17148602; PubMed Central PMCID: PMC1748190.

DENKERS, EY, GAZZINELLI, RT. **Regulation and Function of T-Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection**. Clinical Microbiology Reviews. 11, 569–588, 1998.

DIAS, RAF, FREIRE, RF. 2005. **Surtos de toxoplasmose em animais e seres humanos**. Semina: Ciências Agrárias. 6, 239-248.

DESOLME B, MÉVÉLEC MN, BUZONI-GATEL D, *et al.* **Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by DNA immunization with a plasmid encoding *Toxoplasma gondii* GRA4 gene**. Vaccine. 2000 May 22;18(23):2512-21.

DINIZ, M.O.; FERREIRA, L.C.S. **Biotechnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas**. Estud. av., São Paulo, v.24, n.70, p.19-30, 2010. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142010000300003&lng=pt&nrm=iso>. Acessos em 30 nov. 2015.

DORELLA FA, ESTEVAM EM, CARDOSO PG, *et al.* **An improved protocol for electrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis***. Vet Microbiol. 2006 May 31; 1143-4):298-303. Epub 2006 Jan 26. PubMed PMID: 16442751.

DORELLA FA, ESTEVAM EM, PACHECO LG, *et al.* **In vivo insertional mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins.** Appl Environ Microbiol. 2006 Nov;72(11):7368-72. Epub 2006.

DORELLA, FERNANDA ALVES. 2009; **Análise do potencial vacinal de linhagens recombinantes e selvagens inativadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.** Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. Tese de Doutorado. 191p.

DUBEY, J.P.; **Toxoplasmosis of animals and humans.** 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2010.xvii, 313p.

EFSA, European Food Safety Authority. **Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from EFSA on Surveillance and monitoring of *Toxoplasma* in humans, foods and animals.** *The EFSA Journal.* 583, 1-64, 2007.

EGEN NB, CUEVAS WA, MCNAMARA PJ, *et al.* **Purification of the phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing.** Am J Vet Res. 1989 Aug;50(8):1319-22.

EGGLETON D G, HAYNES J A, MIDDLETON H D, COX J C. **Immunisation against caseous lymphadenitis: correlation between *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid content and protective efficacy in combined clostridial-corynebacterial vaccines.** Aust Vet J. 1991;68:322–325.

ELDAKAK A, HULETT FM. **Cys303 in the histidine kinase PhoR is crucial for the phosphotransfer reaction in the PhoPR two-component system in *Bacillus subtilis*.** J Bacteriol. 2007 Jan;189(2):410-21. Epub 2006 Nov 3

FIALHO, CG, TEIXEIRA, MC, ARAÚJO, FAP. 2009). **Toxoplasmose animal no BRASIL.** Acta Scientiae Veterinariae. 37(1), 1-23.

FILISSETTI D, CANDOLFI E. **Immune response to *Toxoplasma gondii*.** Ann Ist Super Sanita. 2004;40(1):71-80. Review.

FINLAY BB, FALKOW S. **Common themes in microbial pathogenicity revisited.** Microbiol Mol Biol Rev. 1997 Jun;61(2):136-69. Review.

FRANCISCO V.A. NUNES² *, JULIANA R. VAEZ³ , RAYMUNDO R. PINHEIRO A., ANTONIO C.R. CAVALCANTE A., RICARDO W.A. VITOR⁵ E SILVIA M.M. **Ahid Soroprevalência e fatores associados à infecção por *Toxoplasma gondii* em caprinos de propriedades rurais do município de Mossoró, RN.** Pesq. Vet. Bras. 33(5):565-570, maio 2013.

FRENKEL JK, TAYLOR DW. **Toxoplasmosis in immunoglobulin M-suppressed mice.** Infect Immun. 1982 Oct;38(1):360-7.

GARCIA G. 2010. **Soroepidemiologia da toxoplasmose caprina na Mesorregião Metropolitana de Curitiba, Paraná, Brasil.** Dissertação de Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 122p.

GAZZINELLI, RT, AMICHAY, D, SHARTON-KERSTEN, T, *et al.* **Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*.** *Curr Top Microbiol Immunol.* 219,127-139, 1996.

GUIMARÃES AM, ROCHA CM, OLIVEIRA TM, *et al.* Factors associated the seropositivity for Babesia, Toxoplasma, Neospora e Leishmania in dogs attended at nine veterinary clinics in the municipality of Lavras, MG]. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2009 Dec;18 Suppl 1:49-53.

HARNING D, SPENTER J, METSIS A, *et al.* **Recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (P30) expressed in *Escherichia coli* is recognized by human *Toxoplasma*-specific immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies.** *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996 May;3(3):355-7.

HARNING, D, SPENTER, J, METSIS, A, VUUST, J, *et al.* **Recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (P30) expressed in *Escherichia coli* is recognized by human *Toxoplasma*-specific immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies.** *Clin Diagn Lab Immunol.* 3, 355-357, 1996.

HESS, L.; GENTSCHEV, I.; MIKO, D., *et al.* **Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis** *Proc. Nad. Acad. Sci. USA,* 93 (1996), pp. 1458–1463

HODGSON AL, BIRD P, NISBET IT. **Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*.** *J Bacteriol.* 1990 Mar;172(3):1256-61.

IRWIN MR, KNIGHT HD. **Enhanced resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections associated with reduced serum immunoglobulin levels in levamisole-treated mice.** *Infect Immun.* 1975 Nov;12(5):1098-103.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Moléstias Causadas por Bactérias.** In: JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. *Patologia Veterinária.* 6.ed. São Paulo: Manole, p. 489-491, 2000.

KAWAZOE, U. 2005. ***Toxoplasma gondii*.** In: Neves, DP. *Parasitologia Humana.* São Paulo: Atheneu. 11, 494p.

KUR J, HOLEC-GASIOR L, HISZCZYŃSKA-SAWICKA E. **Current status of toxoplasmosis vaccine development.** *Expert Rev Vaccines.* 2009 Jun;8(6):791-808

LANGENNANN, S.; PALASZYRISKI, S.K.; BURLEIN, J.E., *et al.* **Protective humoral response against pneumococcal infection in mice elicited by recombinant**

bacille Calmette-Guerin vaccines expressing pneumococcal surface protein A. J. Exp. Med., 180 (1994), pp. 2277–2286

LEE J. **Development and characterization of expression vectors for *Corynebacterium glutamicum*.** J Microbiol Biotechnol. 2014 Jan;241:70-9. PubMed PMID: 24169455.

LEKUTIS, C, FERGUSON, DJP, BOOTHROYD, JC. 2000. ***Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2.** Exp. Parasitol. 96, 89-96.

LINDSAY, DS, BLAGBURN, BL, BRAUND, KG. 1995. **A review of *Toxoplasma gondii* and muscular Toxoplasmosis.** BAM. 3, 255-260.

LOURENCO, EV, BERNARDES, ES, SILVA, NM, *et al.* (2006). **Immunization with MIC1 and MIC4 induces protective immunity against *Toxoplasma gondii*.** Microbes Infect. 8, 1244- 1251.

LUNDEN, A. **Immune responses in sheep after immunization with *Toxoplasma gondii* antigens incorporated into iscoms.** Vet Parasitol. 56, 23-35, 1995.

MACHADO, AV, CAETANO, BC, *et al.* (2010). **Prime and boost immunization with influenza and adenovirus encoding the *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 (SAG2) induces strong protective immunity.** Vaccine. 28(18), 3247-3256.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acessado em: 24 Abr 2014.

MARTIN, V, SUPANITSKY, A, ECHEVERRIA, PC, *et al.* **Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with alum or the *gra4* gene provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis.** Clin Diagn Lab Immunol. 11, 704- 710, 2004.

MATTOS-GUARALDI AL, DUARTE FORMIGA LC, PEREIRA GA. **Cell surface components and adhesion in *Corynebacterium diphtheriae*.** Microbes Infect. 2000 Oct;2(12):1507-12.Review.

MCNAMARA, PJ, BRADLEY, GA, SONGER, JG. (1994). **Targeted mutagenesis of the phospholipase D results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*,** Mol. Microbiol. 12, 921–930.

MEDEIROS A.D. 2010. **Ocorrência da infecção por *Toxoplasma gondii* e avaliação da imunização em caprinos do Sertão do Cabugi, Rio Grande do Norte.** Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN. 94p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças infecciosas e parasitárias:** Guia de Bolso. Secretaria de vigilância em saúde, Departamento de vigilância epidemiológica. Brasil. 8, 444p., 2010.

MISHIMA, M, XUAN, X, SHIODA, A, *et al.* **Modified protection against *Toxoplasma gondii* lethalinfection and brain cyst formation by vaccination with SAG2 and SRS1.** J Vet Med Sci. 63, 433-438, 2001.

MONDS RD, NEWELL PD, SCHWARTZMAN JA, *et al.* **Conservation of the Pho regulon in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1.** Appl Environ Microbiol. 2006

MOORE RJ, ROTHEL L, KRYWULT J, RADFORD AJ, LUND K, HODGSON AL. **Foreign gene expression in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: development of a live vaccine vector.** Vaccine. 1999 Oct 14;18(5-6):487-97. PubMed PMID: 10519938.

MORAES, P.M.R.O. 2012. **Caracterização do internalizador de peptídeos Opp em *Corynebacterium pseudotuberculosis* e o estudo do seu papel na virulência e patogenicidade dessa bactéria.** Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. Dissertação Mestrado) 100p.

MUCKLE, CA, GYLES, CL. **Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*.** Can. J. Comp. Med. 46, 206–208., 1982.

MUNDAY BL, MASON RW. **Toxoplasmosis as a cause of perinatal death in goats.** Aust Vet J. 1979 Oct;55(10):485-7.

NAGEL, SD, BOOTHROYD, JC. **The major surface antigen, P30, of *Toxoplasma gondii* is anchored by a glycolipid.** J. Biol. Chem. 264, 5569-5574, 1989.

OMS. Organização Mundial de Saúde. 2010

PARKER, SJ, ROBERTS, CW, ALEXANDER J. **CD8+ T cells are the major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to *Toxoplasma gondii* in mice.** Clinical and Exp. Immunol. 84, 207–212, 1991.

PATON, M.W.; ROSE, I.R. HART, R.A.. *et al.* **New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production.** Aust. Vet. J., v. 71, p. 47–49, 1994.

PAULE BJ, AZEVEDO V, REGIS LF, *et al.* **Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon-gamma production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting.** Vet Immunol Immunopathol. 2003 Dec 15;96(3-4):129-39

PAVIA, CS. **Protection against experimental Toxoplasmosis by adoptive immunotherapy.** J. Immunol. 137, 2985-2990, 1986.

PIONTKOWSKI, M.D.; SHIVVERS, D.W. **Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep.** J. Am. Vet. Med. Assoc. v. 212, p. 1765–1768, 1998.

POISSON, ISABELLE DIMIER. **Major role for CD8 T cells in the protection against *Toxoplasma gondii* following dendritic cell vaccination.** Parasite Immunol. 2012 Oct;31(10):631-40.

RADOSTITS OM, GAY CC, HINCHCLIFF KW, CONSTABLE PD: **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats**. Philadelphia: Saunders; 2007.

RAGOZO A.M.A. 2007. **Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* de ovinos e caprinos**. Tese de Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 144 p.

RIBEIRO MG, JÚNIOR JGD, PAES AC, *et al.* 2001. **Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina**. Arq Inst Biol 68: 23-28. Rice P, Longden I, Bleasby A. 2000. Emboss: the European molecular biology open software suite. Trends Genet. 16: 276-277.

RIBEIRO, Dayana; AZEVEDO, Vaso. **Avaliação da cinética da infecção por uma linhagem atenuada de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em camundongos e caprinos**. 2013. 170 f. Teses (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

RIBEIRO, D.; ROCHA, F.; LEITE, K.M.; *et al.* **An iron-acquisition-deficient mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis* efficiently protects mice against challenge**. ^{JCR} Veterinary Research , v. 45, p. 28, 2014.

SACKS, JJ, ROBERTO, RR, BROOKS, NF. **Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk**. JAMA. 248, 1728–32, 1982.

SAMBROOK J, RUSSEL DW. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor; 2001

SEBRAE. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2011/2012 a 2021/2022** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. – Brasília: Mapa/ACS, 2012. 76 p.

SEYFFERT, N.; GUIMARÃES, A.S.; PACHECO, L.G.C. *et al.* **High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA**. ^{JCR} Research in Veterinary Science, v. 88, p. 50-55, 2010.

SILVA JW, DROPPA-ALMEIDA D, BORSUK S, *et al.*, ***Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40 recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis**. BMC Vet Res. 2014 Dec 20;10:965. doi: 10.1186/s12917-014-0304-6. PubMed PMID: 25527190; PubMed Central PMCID: PMC4297461.

SIMMONS CP, HODGSON AL, STRUGNELL RA. **Attenuation and vaccine potential of aroQ mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis***. Infect Immun. 1997 Aug;65(8):3048-56. PubMed PMID: 9234753; PubMed Central PMCID: PMC175430.

SONGER JG, LIBBY SJ, IANDOLO JJ, *et al.* **Cloning and expression of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*.** Infect Immun. 1990 Jan;58(1):131-6.

STANFORD K, BROGDEN KA, MCCLELLAND LA, *et al* **The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines.** Can J Vet Res. 1998 Jan;62(1):38-43.

SUZUKI, Y, WANG, X, JORTNER, *et al.* (2010). **Removal of *Toxoplasma gondii* cysts from the brain by perforin-mediated activity of CD8+ T cells.** Am J Pathol. 176,1607-1613.

TENTER, AM, HECKEROTH, AR, WEISS, LM. 2000 ***Toxoplasma gondii*: from animals to humans.** Int J Parasitol. 30, 1217-1258.

TROST, E., OTT, L., SCHNEIDER, J.,*et al.* 2010. **The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence.** BMC Genomics 11, 728.

WEISS, LM, DUBEY, JP. 2009 **Toxoplasmosis: a history of clinical observations.** Int J Parasitol. 39(8), 895-901.

WEISSMANN, J. **Presumptive *Toxoplasma gondii* abortion in a sheep.** Canadian Veterinary Journal, v. 44, p.322-324, 2003.

WILLIAMSON, LH. 2001. **Caseous lymphadenitis in small ruminants.** Vet. Clin. North Am. Food Anim. 17, 359–371.

WILSON, CB, TSAI, V, REMINGTON, JS. (1980). **Failure to trigger the oxidative metabolic burst by normal macrophages.** J. Exp. Med. 151, 328-346

WINDSOR PA. **Control of caseous lymphadenitis.** Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2011 Mar;271):193-202.

ZWIR I, SHIN D, KATO A, *et al.* **Dissecting the PhoP regulatory network of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Feb 22;102(8):2862-7. Epub 2005 Feb 9.