

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Efeito da imunização com vacina do antígeno recombinante de superfície SpaA de
Erysipelothrix rhusiopathiae - modelo murino**

Luciana Camillo

**Orientadora: Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal - DMP
Co-orientador: Prof. Dr. Adilson José da Silva - DEQ**

**SÃO CARLOS
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA**

LUCIANA CAMILLO

Efeito da imunização com vacina do antígeno recombinante de superfície SpaA de *Erysipelothrix rhusiopathiae* - modelo murino

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, para obtenção do título de mestre.

***Orientação: Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
Co-orientação: Prof. Dr. Adilson José da Silva***

**SÃO CARLOS - SP
2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C183e Camillo, Luciana
Efeito da imunização com vacina do antígeno
recombinante de superfície SpaA de *Erysipelothrix*
rhusiopathiae : modelo murino / Luciana Camillo. --
São Carlos : UFSCar, 2016.
75 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2015.

1. *Erysipelothrix rhusiopathiae*. 2. Vacina. 3.
SpaA. 4. *Salmonella*. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia
Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Luciana Camillo, realizada em 03/03/2015:

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar

Prof. Dr. Adilson Jose da Silva
UFSCar

Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami
UFSCar

Profa. Dra. Juliane M. G. Tanomaru
UNESP

**Dedico este trabalho a minha família,
por todo apoio e incentivo.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal e ao Prof. Dr. Adilson José da Silva pela orientação científica e pela confiança, em mim depositada, para realizar este trabalho de mestrado. Só tenho a agradecer pelo apoio, paciência e disponibilidade.

Agradeço às professoras Dra. Teresa Cristina Zangirolami, Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur e Dra. Ana Afonso, pelo apoio que recebi durante esses dois anos de pesquisa e pela disponibilidade nos momentos em que precisei.

Agradeço à Prof. Dra. Lucia Helena Facioli por disponibilizar seu laboratório para a realização de alguns experimentos e à técnica responsável Alyne Favero Galvão, que nos ajudou muito nos experimentos.

Agradeço à Dra. Elizabeth A. Martins do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, São Paulo-SP, que nos cedeu a cepa da bactéria atenuada que utilizamos como linhagem vacinal.

Agradeço à toda equipe do Laboratório de Parasitologia, pelo companheirismo e pela ajuda nos experimentos. Eles me ajudaram muito, desde procedimentos simples até os mais

cansativos. É muito bom trabalhar num laboratório com um clima tão gostoso como o nosso, e devo isso a eles. Agradeço em especial à Joice, Sandra, Débora, Maurício, Luciana, Túlio, Giovana, Carol, Aline, Karina e Ricardo.

Agradeço aos meus companheiros do Laboratório de Biotecnologia - DEQ, que sempre me ajudaram muito nos experimentos e sempre estiveram disponíveis para me acompanhar na rotina de laboratório. Agradeço em especial à Cíntia, Marília, Gilson e Gabriel.

Agradeço à toda a equipe do departamento de Morfologia e Patologia e do Departamento de Engenharia Química, que sempre estiveram à disposição quando eu precisei.

Agradeço à Secretária do PPGGEV, Ivanídes, que sempre esteve à disposição com muita paciência e empenho em ajudar.

Agradeço à minha família: minha mãe Nisabel, meu pai José Antonio e ao meu irmão Juliano. Minha vida não teria sentido sem eles. Agradeço pela confiança e pelo apoio nas decisões tomadas.

Agradeço ao meu namorado, Alexandre, que sempre me apoia e que durante a pesquisa ouviu minhas alegrias e

*lamentações com paciência, se tornando meu ponto de apoio.
Agradeço pela confiança e pelo carinho.*

*Agradeço aos demais amigos, que sempre me apoiaram e
deixaram meus dias mais felizes mesmo quando encontrava
dificuldades na pesquisa. Agradeço em especial à Laís, Paula,
Raphael e Vinícius.*

*Agradeço à Capes e à FAPESP pelo apoio financeiro, sem o
qual não seria possível a realização desse trabalho.*

RESUMO

A erisipela suína é uma enfermidade causada pela bactéria *Erysipelothrix rhusiopathiae*, distribuída de forma global. A criação de suínos está em expansão, e a carne suína é a mais consumida no mundo. Grandes investimentos têm sido realizados para o aumento destes rebanhos, com destaque para a busca por vacinas. A doença é prevenida atualmente pela vacinação de parte dos rebanhos, porém as formulações existentes (patógeno inativado ou atenuado) podem agravar problemas de artrite nesses animais. Para as novas vacinas em desenvolvimento, livres das células de *E. rhusiopathiae*, a proteína SpaA (*Surface protective antigen A*) aparece como principal antígeno em estudo. Neste trabalho, avaliamos, em modelo murino, a resposta imunológica e a eficiência de duas formulações baseadas no antígeno SpaA, e comparamos os resultados obtidos com uma vacina comercial preparada com células inativadas do patógeno. As formulações usadas foram: a) células vivas de *Salmonella typhimurium*– SL3261 recombinante atenuada, expressando SpaA; b) proteína SpaA purificada + hidróxido de alumínio (v/v). Após imunização e desafio dos animais, foi avaliada a produção de anticorpos (método ELISA) e o perfil inflamatório frente à infecção por *E. rhusiopathiae* de forma sistêmica. Os resultados obtidos mostraram que o antígeno purificado foi capaz de promover 50 % de proteção (desafio com uma super-dose de 50xDL₅₀) de uma cepa virulenta de *E. rhusiopathiae*. No desafio com a DL₅₀, foi feita análise do perfil celular, da produção de anticorpos, além de dosagem de interleucinas. A vacina de proteína purificada promoveu modulação negativa da saída das células inflamatórias da medula óssea para o sangue, em relação ao grupo apenas infectado. Houve produção de IgG específicos contra rSpaA, sendo a vacina de proteína purificada mais antigênica quando comparada a vacina comercial e a de *Salmonella* recombinante. Pela análise de interleucinas (IL-4 e IL-12) e das subclasses IgG1 e IgG2a, observamos que as vacinas estimulam tanto a resposta Th1 quanto a Th2, sendo observada maior tendência de resposta Th2. Assim, esses dados sugerem que, apenas a proteína purificada SpaA é capaz de estimular uma resposta imune de caráter protetor, diminuindo o risco de comprometimentos secundários como os que ocorrem com a utilização de vacinas com patógenos apenas inativados.

palavras chave: *Erysipelothrix rhusiopathiae*, vacina, SpaA, *Salmonella*

ABSTRACT

The swine erysipelas is a disease caused by the bacterium *Erysipelothrix rhusiopathiae*, globally distributed. The pig farming is expanding, and pork is the most consumed in the world. Large investments have been made to increase these herds, especially in the search for vaccines. The disease is currently prevented by vaccination of flocks, but the existing formulations (inactive or attenuated pathogen) can aggravate problems of arthritis in these animals. For the development of new vaccines, free of *E. rhusiopathiae* cells, the protein SpaA (*Surface protective antigen A*) appears as a major antigen in studies. We evaluate, in mice, the immune response and the efficiency of two formulations based on SpaA antigen, and compared the results obtained with a commercial vaccine prepared with inactivated cells of the pathogen. The formulations used were: a) living cells of recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* - SL3261 expressing SpaA; b) SpaA purified protein and aluminum hydroxide (v/v). After immunization and challenge of the animals, we evaluated production of antibodies (ELISA) and the inflammatory cells profile systemic infection by *E. rhusiopathiae*. The results showed that the purified antigen can promote 50% protection (with an over-dose challenge 50xDL50) of a virulent *E. rhusiopathiae*. In the DL50 challenge, we analyze the cellular profile, antibody production, and interleukin dosage. The purified protein vaccine promoted negative modulation of the output inflammatory cells from bone marrow into the blood, compared to only infected group. There was a specific IgG production against rSpaA, and the most antigenic vaccine was the purified protein, compared to commercial vaccine and recombinant *Salmonella* vaccine. By analysis of interleukins (IL-4 and IL-12) and IgG1 and IgG2a subclasses, we found that vaccines stimulate both the Th1 response as Th2, being observed more likely to Th2 response. Thus, these data suggest that SpaA purified protein is capable of stimulating an immune response with protective character, reducing the risk of secondary impairments like those occurring with the use of inactivated vaccines to pathogens.

keywords: *Erysipelothrix rhusiopathiae*, vaccine, SpaA, *Salmonella*

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Agente etiológico - <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	15
1.2 Patologias causadas pela <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	17
1.3 Fatores de virulência - <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	18
1.4 SpaA (<i>Surface protective antigen A</i>) – Principal antígeno	19
1.5 Resposta Imune e vacina existente	20
1.6 Vacina de Subunidade	22
1.7 Proteínas recombinantes - componentes antigênicos.....	23
1.8 Vacina de vetores bacterianos vivos	24
1.9 <i>Salmonella sp.</i> : Aspectos gerais e vetores vacinais	26
1.10 Vacina Comercial SUIVAC – ERY IN	28
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Animais.....	30
3.2 Microrganismos como vetores vacinais.....	30
3.3 Preparação de estoque de células eletrocompetentes de <i>S. Typhimurium</i> SL3261	31
3.4 Transformação por eletroporação e confirmação dos clones de <i>S. Typhimurium</i> SL3261 recombinante	31
3.5 Confirmação da linhagem de células <i>S. typhimurium</i> SL3261 transformadas com a construção pMOhly1_ <i>spaA</i>	32
3.6 Preparação da vacina de vetor bacteriano vivo.....	33
3.7 Purificação da proteína rSpaA da <i>E. coli</i>	33
3.8 Preparação da vacina de proteína rSpaA purificada	34
3.9 Administrações das vacinas aos camundongos	34
3.10 Infecção dos camundongos com <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	35
3.11 Obtenção das células do sangue.....	36
3.12 Análise de anticorpos (ELISA) IgG total, IgG1 e IgG2a	36
3.12.1 Soluções utilizadas no ELISA	37
3.13 Análise da produção de IL-4 e IL-12 por ELISA	38
3.14 Análise estatística	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1 Administração da vacina de subunidade composta pela proteína purificada acrescida de hidróxido de alumínio (adjuvante) e infecção com 50xDL50 (desafio) 40	

4.2	Tabelas de sobrevivência	42
4.3	Perfil de leucócitos no sangue - animais heterogênicos.....	43
4.3.1	Contagem de células totais no sangue de animais imunizados com vacina de proteína purificada ou vacina comercial e desafiados ou não com <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	43
4.3.2.	Contagem diferencial de células no sangue de animais imunizados com vacina de proteína purificada ou vacina comercial e desafiados ou não com <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	45
4.4	Perfil de leucócitos no sangue - animais isogênicos.....	47
4.4.1	Contagem de células totais no sangue de animais imunizados com vacina de proteína purificada, vacina de <i>Salmonella</i> recombinante ou vacina comercial e desafiados ou não com <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	47
4.4.2.	Contagem diferencial de células no sangue de animais imunizados com vacina de proteína purificada, vacina de <i>Salmonella</i> recombinante ou vacina comercial e desafiados ou não com <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	49
4.5	Produção de IgGtotal, IgG1 e IgG2a nos diferentes grupos	51
4.5.1	Análise da produção de anticorpos - animais heterogênicos	51
4.5.2	Análise da produção de anticorpos - animais isogênicos	53
4.6	Produção de IL-4 e IL-12 nos diferentes grupos	55
4.6.1	Análise da produção de IL-4 e IL-12 - animais heterogênicos.....	55
4.6.2	Análise da produção de IL-4 e IL-12 - animais isogênicos	57
4.7	Comparação entre os títulos de imunoglobulinas produzidas pelas diferentes vacinas	59
4.8	Comparação entre os títulos de interleucinas produzidas pelas diferentes vacinas	60
5.	DISCUSSÃO.....	61
6.	CONCLUSÕES.....	68
7.	BIBLIOGRAFIA.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aro: aromático

BALB/c: camundongo albino de linhagem isogênica

BSA: soro albumina bovina

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

DHB: dihidroxibenzóico

DL50: dose letal para 50% dos animais

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTPs: desoxirribonucleotídeos fosfatados

DO: densidade óptica

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

E. inopinata: *Erysipelothrix inopinata*

E. rhusiopathiae: *Erysipelothrix rhusiopathiae*

E. tonsillarum: *Erysipelothrix tonsillarum*

FAO: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação/*Food and Agriculture Organization*

Fig: figura

GALT: tecido linfoide associado ao intestino

HCl: ácido clorídrico

H₂O: água

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

H₂SO₄: ácido sulfúrico

IL-4: interleucina 4

IL-12: interleucina 12

IgG: imunoglobulina

IgG1: imunoglobulina do isotipo 1

IgG2a: imunoglobulina do isotipo 2a

IgGtotal: imunoglobulina total

KCl: cloreto de potássio

kDa: kilo Dalton

KH₂PO₄: fosfato de potássio monobásico

LB: meio de cultura *Luria-Bertani*

L. monocytogenes: *Listeria monocytogenes*

MgCl₂: cloreto de magnésio
NaCl: cloreto de sódio
Na₂CO₃: carbonato de sódio
NaHCO₃: bicarbonato de sódio
Na₂HPO₄: fosfato de sódio dibásico
(NH₄)₂SO₄: sulfato de amônio
OPD: o-dihidrocloro de fenilenediamina
pABA: ácido p-aminobenzóico
PBS: solução salina tamponada com fosfato
PCR: *Polimerase Chain Reaction*
pH: potencial hidrogeniônico
ROS: espécie reativa de oxigênio
Rpm: rotação por minuto
rSpaA: proteína SpaA recombinante
SpaA: Surface protective antigen A
SL3261: linhagem de *Salmonella* atenuada 3261
SPF: specific pathogen free
SWISS: camundongo de linhagem não isogênica
Th1: linfócito T *helper* 1
Th2: linfócito T *helper* 2
TMB: tetrametilbenzidina
UFC: unidade formadora de colônia
VBV: vetor bacteriano vivo
2YT: meio de cultura 2YT
50xDL₅₀: 50 vezes a dose letal para 50% dos animais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Curva de sobrevivência dos animais desafiados com 50xDL50.....	43
Figura 2: Contagem total de células no sangue de animais heterogênicos, 7 dias após a infecção.	46
Figura 3: Contagem de neutrófilos, células mononucleares e eosinófilos no sangue de animais heterogênicos, 7 dias após a infecção.....	48
Figura 4: Contagem total de células no sangue de animais isogênicos, 7 dias após a infecção.....	50
Figura 5: Contagem de neutrófilos, células mononucleares e eosinófilos no sangue de animais isogênicos, 7 dias após a infecção.....	52
Figura 6: Título de IgGtotal, IgG1 e IgG2a no sangue de animais heterogênicos, 7 dias após a infecção.	54
Figura 7: Títulos de IgGtotal, IgG1 e IgG2a no sangue de animais isogênicos, 7 dias após a infecção.	56
Figura 8: Concentração de IL-4 e IL-12 no sangue de animais heterogênicos, 7 dias após a infecção.	58
Figura 9: Concentração de IL-4 e IL-12 no sangue de animais isogênicos, 7 dias após a infecção.	60
Figura 10: Produção de IgG medido por ELISA em dois experimentos independentes.....	61
Figura 11: IL-4 e IL-12 medidos por ELISA em pg/mL em dois experimentos independentes.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados do primeiro experimento (animais Swiss), onde são demonstradas as porcentagens de sobrevivência dos animais vacinados.....44

Tabela 2: Dados do primeiro experimento (animais BALB/c), onde são demonstradas as porcentagens de sobrevivência dos animais vacinados.....44

1. INTRODUÇÃO

A suinocultura é uma atividade econômica em expansão e dados da FAO (*Food and Agriculture Organization*) indicam que a carne suína é a mais consumida no mundo. O Brasil ocupa a 4ª colocação entre os maiores produtores mundiais (FAO, 2015). Nesse contexto, grandes investimentos têm sido realizados para viabilizar um aumento na produtividade dos rebanhos, sendo uma das prioridades a busca por vacinas para as principais doenças que acometem os suínos.

A erisipela suína está distribuída de forma global, juntamente com a pneumonia enzoótica e a disenteria suína, e está entre as enfermidades que causam os maiores prejuízos na suinocultura mundial (MAKINO *et al.*, 1998). A doença é causada pela bactéria *Erysipelothrix rhusiopathiae* e apresenta quadros de artrite, endocardite e septicemia, entre outros sintomas, podendo levar os animais a óbito em sua forma aguda (WOOD, 1992). Atualmente o controle à erisipela suína é feito por meio de vacinas com células de *E. rhusiopathiae* inativadas ou atenuadas, mas as formulações disponíveis não são capazes de evitar que os animais manifestem a forma crônica da doença e podem agravar os sintomas de artrite (WOOD, 1992), possivelmente pela necessidade de serem ministrados reforços da vacina em períodos curtos. Em vista disso, tem-se buscado desenvolver novas vacinas que previnam essa enfermidade, que sejam mais eficazes e que não causem efeitos colaterais.

Com os avanços da biologia molecular, uma nova geração de vacinas tem surgido, em que novos alvos antigênicos e novos métodos de produção e veiculação de antígenos, estão sendo estudados. Além disso, busca-se também a criação de novas plataformas de produção e veiculação desses antígenos. A maior compreensão do funcionamento do sistema imunológico vem possibilitando o direcionamento dos

antígenos para promover mais seletivamente respostas imunes adequadas para a prevenção das doenças provocadas por cada classe de distintos patógenos, bem como a possibilidade de explorar as propriedades imunoadjuvantes de citocinas e outras moléculas com efeito estimulatório à resposta imune (SILVA *et al*, 2012).

Assim, novos sistemas de vacinação vêm sendo desenvolvidos, nas últimas décadas, com finalidade de produzir vacinas mais eficazes, seguras e de fácil administração. Além disso, busca-se também desenvolver novas vacinas para doenças em que ainda não há formulações eficientes capazes de formar uma imunidade prévia. Essas novas tecnologias empregadas na produção de vacinas envolvem basicamente o desenvolvimento de vacinas de subunidade de natureza variada, como proteínas recombinantes ou moléculas de DNA e a criação de vetores recombinantes vivos, bacterianos ou virais (SILVA *et al*, 2012).

Em relação à erisipela suína, alguns antígenos da bactéria *Erysipelothrix rhusiopathiae* já foram identificados e novas propostas vacinais para esta doença têm sido descritas na literatura. Para as novas formulações em desenvolvimento, a proteína SpaA aparece como principal antígeno em estudo. Experimentos realizados por diferentes grupos (SILVA *et al*, 2012; MAKINO *et al.*, 1998; IMADA *et al.*, 1999; SHIMOJI *et al.*, 1999; KITAJIMA *et al.*, 2000; YOKOMIZO *et al.*, 2002; CHEUN *et al.*, 2004) em modelo murino e/ou em suínos mostraram que este antígeno é capaz de induzir a produção de anticorpos protetores nos animais vacinados, e estes apresentam alta taxa de sobrevivência quando desafiados com cepas virulentas do patógeno.

1.1 Agente etiológico - *Erysipelothrix rhusiopathiae*

Erysipelothrix rhusiopathiae é um bacilo Gram-positivo (embora possa parecer Gram-negativo porque descolore rapidamente no teste de Gram), anaeróbio facultativo, não formador de esporos, sem mobilidade e classificado no gênero *Erysipelothrix* juntamente com outras duas espécies, *E. tonsillarum* e *E. inopinata* (STACKEBRANDT e GENUS, 2009). Seu crescimento ocorre em temperaturas que variam de 15 a 44°C, sendo a temperatura ótima entre 30 e 37°C, o pH ótimo na faixa de 7,2 a 7,6, mas pode variar entre 6,7 e 9,2 (SILVA *et al.*, 2012). Essa bactéria é capaz de sobreviver por um longo período de tempo no ambiente, inclusive em locais marinhos. Apresenta-se também como um organismo patogênico ou comensal em uma grande variedade de animais domésticos e selvagens, como pássaros e peixes (WANG *et al.*, 2010). Segundo estimativa, cerca de 30 a 50 % dos suínos sadios alojam o microrganismo em suas tonsilas e órgãos linfóides (WOOD, 1992), sendo considerados reservatórios desse agente etiológico. A espécie *E. rhusiopathiae* é classificada em 23 sorotipos e o tipo N, de acordo com os antígenos peptidoglicanos da parede celular da bactéria (KUCSERA, 1973). Os suínos são suscetíveis a 15 sorotipos, sendo que o sorotipo 1 (subdividido em 1a e 1b) e o sorotipo 2 (subdividido em 2a e 2b) são os mais importantes na suinocultura. Cerca de 80% das linhagens de *E. rhusiopathiae* isoladas de suínos pertencem aos sorotipos 1a, 1b e 2b (WOOD e HARRINGTON JR, 1978). Em um estudo recente, 151 isolados de *Erysipelothrix spp.* de suínos no Brasil foram genotipados e o sorotipo 2b apresentou a maior frequência (39,7 %) entre as amostras analisadas (COUTINHO *et al.*, 2011).

Há poucos anos foi publicado o primeiro sequenciamento do genoma da espécie *E. rhusiopathiae*, da linhagem Fujisawa. Foram identificados genes ligados à capacidade de o microrganismo sobreviver no interior de fagócitos e diversos outros ligados a fatores de virulência associados à parede celular, como os de biossíntese da

cápsula polissacarídica e de algumas adesinas, além de outros genes (OGAWA et al., 2011).

1.2 Patologias causadas pela *Erysipelothrix rhusiopathiae*

A doença nos suínos representa o maior impacto comercial provocado por infecções causadas por *E. rhusiopathiae*, porém infecções em carneiros, perus e patos também são de importância econômica (CONKLIN e STEELE, 1979). Em suínos, *E. rhusiopathiae* causa a erisipela, enfermidade do tipo hemorrágica que pode provocar septicemia aguda ou subaguda e lesões crônicas proliferativas (WANG *et al.*, 2010). A forma aguda é caracterizada por morte repentina ou sinais gerais de septicemia. A forma subaguda apresenta sinais menos severos que a forma aguda, em que há formação de lesões de pele de cor púrpura, na forma de diamantes, situadas no abdômen e no dorso dos animais que podem ser vistas no segundo ou terceiro dia após infecção. Essa forma menos severa da doença pode ser devido a contaminação com menor dose do patógeno, infecção com linhagens menos virulentas, ou ainda por proteção parcial pré-existente, promovida por vacinação ou anticorpos protetores de origem materna (BRADFORD e SHIVE, 1998).

A forma crônica é caracterizada por sinais de artrite local e endocardite. Do ponto de vista econômico, a artrite crônica é a manifestação clínica mais importante da erisipela suína. Ocorrem também, falhas reprodutivas: nos machos a doença afeta a produção das células espermiogênicas, e nas fêmeas pode induzir o aborto (WANG *et al.*, 2010).

A *E. rhusiopathiae* pode causar três tipos de quadros clínicos em humanos. O mais comum é caracterizado por lesão cutânea localizada chamada de erisipelóide (assim denominada para diferenciá-la da erisipela humana causada por estreptococos),

que geralmente ocorre nas mãos e dedos, podendo apresentar inflamação nas articulações próximas a região. Os outros quadros incluem uma lesão de pele generalizada, e casos raros de uma forma septicêmica que geralmente se associa à endocardite (BROOKE e RILEY, 1999). A literatura relata cerca de 80 casos de endocardite humana (TOMASZUK-KAZBERUK *et al.*, 2011). A contaminação ocorre através de ferimentos na pele, sendo a ocorrência por outras vias de penetração, muito rara (STRAW *et al.*, 1999). A infecção por *E. rhusiopathiae* é considerada uma doença ocupacional, acometendo agricultores, pescadores, veterinários, trabalhadores de curtumes, laboratoristas, pessoas que trabalham com manipulação ou processamento de carne, entre outros (REBOLI e FARRAR, 1989).

1.3 Fatores de virulência - *Erysipelothrix rhusiopathiae*

A presença de uma cápsula foi descrita neste microrganismo, e a mesma foi identificada como um antígeno não protéico com massa molecular de 14 a 22 kDa (LACHMANN e DEICHER, 1986). Alguns estudos posteriores revelaram que esta estrutura estava relacionada com a patogenicidade, sendo responsável pela resistência da bactéria à fagocitose, e mutantes sem cápsula se mostraram avirulentos em testes com camundongos (SHIMOJI *et al.*, 1994). O sequenciamento do genoma revelou que o microrganismo possui um cluster de genes (ERH_0855 a ERH_0861) que codifica sete proteínas que parecem estar envolvidas na biossíntese do polissacarídeo capsular (OGAWA *et al.*, 2011).

A enzima neuraminidase aparece como outro fator de virulência identificado (SHIMOJI, 2000), desempenhando importante papel na adesão da bactéria e posterior invasão das células hospedeiras. A enzima hialuronidase, cuja ação é facilitar a disseminação de alguns patógenos nos tecidos do hospedeiro, foi detectada em

linhagens virulentas e avirulentas de *E. rhusiopathiae*, mas seu papel na patogênese da doença ainda não é confirmado. Foram encontrados três genes que codificam hialuronidases (ERH_0150, 0765 e 1210). Alguns autores sugerem que essa enzima não apresenta papel essencial no mecanismo de infecção (SHIMOJI *et al.*, 1994).

A habilidade de sobrevivência no interior das células dos organismos infectados é a principal característica ligada à patogenicidade de *E. rhusiopathiae*. Quando não há anticorpos específicos, o organismo evade a fagocitose pelas células fagocitárias e, se for fagocitado, é capaz de se replicar no interior dessas células (SHIMOJI, 2000). Segundo dados do genoma, existem nove fatores antioxidantes, que podem conferir ao microrganismo resistência a espécies reativas de oxigênio (ROS). Há também nove fosfolipases, que são consideradas fatores de virulência em muitos outros patógenos intracelulares (SCHMIEL e MILLER, 1999) e que tornam o microrganismo apto escapar do fagossomo para o citoplasma da célula, por meio de um rompimento da membrana fagossomal (OGAWA *et al.*, 2011).

Outro fator importante na virulência de *E. rhusiopathiae* é o processo de adesão e duas adesinas (RspA e RspB) já foram identificadas nesta bactéria (SHIMOJI *et al.*, 2003) antes mesmo do sequenciamento do genoma. Existem também outras 22 proteínas de superfície descritas como possíveis fatores de virulência desta bactéria após o sequenciamento do genoma (OGAWA *et al.*, 2011).

1.4 SpaA (*Surface protective antigen A*) – Principal antígeno

Estudos sobre *E. rhusiopathiae* relatando a identificação e caracterização de diferentes antígenos, em culturas de diversas linhagens de *E. rhusiopathiae*, vem sendo publicados desde a década de 70. O SpaA (*Surface protective antigen A*) aparece como principal antígeno e trata-se de um antígeno de superfície de *E. rhusiopathiae* (sorotipo

2, linhagem Tama-96) de 606 resíduos de aminoácidos e 64 kDa. Foi produzido em *E. coli* e o epítipo protetor da SpaA foi localizado na região N-terminal (SHIMOJI *et al.*, 1999). Posteriormente, foi produzida uma proteína truncada contendo essa região N-terminal com um hexâmero de histidina adicionado (IMADA *et al.*, 1999). Essa proteína foi capaz de proteger suínos nos testes de imunização contra linhagens virulentas de *E. rhusiopathiae* sorotipos 1a e 2b (linhagens Fujisawa e 82-875 respectivamente).

Foi estudada também a reação do antisoro, em camundongos e suínos, com uma proteína de 43 kDa, identificada como um fragmento da SpaA. A análise da sequência de aminoácidos da SpaA revelou uma região C-terminal composta por oito repetições de vinte aminoácidos cada, iniciadas pelo dipeptídeo glicina-triptofano (GW) (MAKINO *et al.*, 1998).

1.5 Resposta Imune e vacina existente

Tanto a imunidade humoral quanto a mediada por células tem um papel importante na defesa do organismo infectado por *E. rhusiopathiae* (SHIMOJI, 2000). O papel protetor de anticorpos específicos na infecção é atestado pela imunização com bacterinas (formulações com células inativadas do patógeno) ou tratamento com antissoro para o controle da doença. A atividade protetora dos soros imunes está relacionada à ação de opsonização de anticorpos IgG (SHIMOJI *et al.*, 1994) e a proteína SpaA é capaz de induzir a produção desses anticorpos protetores (IMADA *et al.*, 1999).

A importância da imunidade celular na proteção contra a erisipela suína foi demonstrada usando uma linhagem mutante de *E. rhusiopathiae* sem cápsula (SHIMOJI *et al.*, 1994). Experimentos de imunização usando essa linhagem viva em camundongos

resultaram em uma proteção completa e de longa duração. A proliferação de células do baço, coletadas após imunização em resposta a antígenos do patógeno, e o efeito de proteção cruzada destas células contra outro patógeno intracelular antígenicamente não relacionado (*L. monocytogenes*) mostraram a indução da imunidade mediada por células (SHIMOJI, 2000).

Outro fator importante na resposta imunológica dos animais contra a *E. rhusiopathiae* é a ação das citocinas. As citocinas constituem uma família de mediadores protéicos tanto da imunidade inata como da específica. As ações de diferentes citocinas são, muitas vezes, redundantes e exercem influência nas ações de outras citocinas. De modo geral, as citocinas são sintetizadas em resposta à estímulos inflamatórios ou antigênicos e atuam localmente, ligando-se à receptores de alta afinidade nas células alvo (ABBAS, AK *et al.*,2000; VARELLA, 2001).

As vacinas disponíveis atualmente para a prevenção da erisipela suína são produzidas com a bactéria atenuada ou inativada. Tem sido sugerido que o uso dessas vacinas celulares pode agravar os problemas de artrite pela hipersensibilização do animal a contatos subsequentes com o microrganismo (FREEMAN, 1964; WOOD, 1992). Com certa frequência, ocorrem falhas na imunização: IMADA e colaboradores (2004) reportaram que 37 % dos casos de erisipela suína crônica detectada nos 11 anos anteriores ocorreram por falha da vacina viva atenuada; EAMENS e colaboradores (2006) também reportaram falhas da vacina na Austrália. A eficácia dessas vacinas varia de acordo com a linhagem utilizada e a duração da imunidade varia entre 6 e 12 meses (SWAN e LINDSEY, 1998), sendo necessários reforços periódicos que possivelmente contribuem para o desenvolvimento da forma crônica da doença, a artrite.

Em vista disso, vários estudos têm sido realizados a fim de identificar os componentes antigênicos de *E. rhusiopathiae* para a produção de uma vacina de subunidade antigênica que seja mais segura e ofereça melhor proteção. Além disso, a produção de vacinas celulares, tanto atenuadas como inativadas, envolve o cultivo em larga escala dos respectivos agentes infecciosos, tendo como desvantagens os riscos inerentes à manipulação de organismos patogênicos e a dificuldade de cultivo dos mesmos em alta densidade. Já na produção de vacinas baseadas em subunidades antigênicas ou em vetores bacterianos vivos (VBVs) são utilizados organismos não virulentos ou atenuados, os quais são geneticamente modificados para potencializar a expressão do antígeno de interesse ou a capacidade de induzir uma resposta imune mais completa (SILVA *et al*, 2012)

1.6 Vacina de Subunidade

O sistema imune necessita apenas de pequenas partes específicas de um patógeno para reconhecê-lo e estimular uma resposta imune específica. É possível que se estimule a resposta imune do indivíduo vacinado sem a necessidade de usar as células inteiras do agente infeccioso. A imunização pode ser realizada com a aplicação apenas de uma proteína antigênica de uma bactéria específica, por exemplo. Na prática, o princípio básico de uma vacina de subunidade é que o gene que codifica o antígeno dessa vacina (no caso de antígenos protéicos) é isolado e transferido para um segundo organismo, normalmente não patogênico. A vacina de subunidade recombinante é então produzida no hospedeiro heterólogo e pode ser projetada para ser veiculada como um imunógeno purificado, um ácido nucléico, ou por meio de vetores específicos (LILJEQVIST e STAHL, 1999).

Existem algumas vantagens em usar essas novas tecnologias, como a eliminação dos riscos inerentes associados como cultivo de microrganismos patogênicos, e também dos riscos de reversão à patogenicidade existente nas vacinas de patógenos atenuados, ou ainda de inativação incompleta no caso das vacinas preparadas com microrganismos inativados. Com essa ferramenta, torna-se possível a busca por vacinas com menos efeitos colaterais e mais eficazes do que as vacinas em uso.

1.7 Proteínas recombinantes - componentes antigênicos

Com os avanços da tecnologia do DNA recombinante e a identificação de componentes antigênicos de diversos patógenos na área da Imunologia, se fez possível a produção de vacinas livres de células, compostas por proteínas recombinantes capazes de estimular o sistema imunológico do organismo vacinado. Tal tecnologia se beneficiou das diversas ferramentas desenvolvidas para a produção de proteínas recombinantes em geral, de forma que uma vasta gama de sistemas de expressão e estratégias de expressão e purificação pode ser aplicada hoje para a produção dessas vacinas de subunidade, aumentando sua aplicabilidade e potencializando sua imunogenicidade (SILVA *et al*, 2012).

A maior parte dos estudos sobre esse tipo de vacina se concentra no desenvolvimento de estratégias que aumentem o grau de imunogenicidade apresentado pelos antígenos vacinais e de sua estabilidade. Nesse contexto, destaca-se a fusão da proteína antigênica com outras proteínas que agregam características desejáveis ao antígeno, como por exemplo, a melhora de sua estabilidade, o aumento de seu potencial imunogênico ou mesmo a capacidade de direcionar sua apresentação ao sistema imunológico (LILJEQVIST e STAHL, 1999).

O principal sistema de expressão desses antígenos recombinantes são os organismos procariontes, principalmente a bactéria *Escherichia coli* (LILJEQVIST e STAHL, 1999), por apresentar baixo custo de produção e outras características, que a tornam a plataforma de expressão mais utilizada para a produção de proteínas recombinantes. Existem algumas desvantagens desse tipo de vacina. Além do risco de serem menos eficientes, vacinas de subunidades antigênicas são mais complexas e mais caras do que as de células inativadas ou atenuadas, devido aos processos de separação e purificação empregados para isolamento dos antígenos. Além disso, geralmente há também necessidade de combinar as proteínas recombinantes com algum adjuvante (SILVA *et al*, 2012).

Adjuvantes são substâncias imunopotencializadoras podendo ser compostos naturais ou sintéticos. O uso de adjuvantes em vacinas é particularmente importante quando o antígeno possui baixa imunogenicidade. Isto se aplica para antígenos constituídos por subunidades de peptídeos e peptídeos recombinantes, cuja estrutura e conformação são menos complexas que vírus e bactérias intactos/inativados.

O hidróxido de alumínio é atualmente o único adjuvante autorizado para uso em humanos e é também utilizado em vacinas veterinárias (FABÍOLA C.B. *et al*, 2004). A composição desses adjuvantes, a estrutura das proteínas recombinantes e o modo de administração das vacinas, tem um forte impacto na resposta imune e no nível de proteção contra os patógenos, que não pode ser completamente predito. Por isso, a eficiência da vacina recombinante dificilmente pode ser prevista. Por fim, múltiplas proteínas e vários modos de administração devem ser avaliados empiricamente e especificamente para cada caso (SOLER e HOUDEBINE, 2007).

1.8 Vacina de vetores bacterianos vivos

Devido ao maior conhecimento acerca do funcionamento do sistema imunológico e dos avanços da tecnologia do DNA recombinante, novos sistemas de vacinação vêm sendo investigados nos últimos anos, e dentre estes novos sistemas encontra-se a utilização de bactérias patogênicas atenuadas como veículos para antígenos heterólogos (LILJEQVIST e STAHL, 1999). Esses vetores bacterianos vivos permitem o desenvolvimento de uma tecnologia de produção de vacinas com larga aplicabilidade, por apresentarem facilidade de manipulação genética e alta imunogenicidade (GENTSCHEV *et al.*, 2002). Além disso, outras vantagens destes sistemas são: custo de produção relativamente barato, o que é conveniente para administração em larga escala; capacidade natural de induzir resposta imunológica mediada por células; baixo risco de reversão à forma patogênica em sistemas imunológicos debilitados, já que a redução de virulência é obtida por manipulação genética (SHATA *et al.*, 2000).

Dentre os exemplos de microrganismos utilizados, encontram-se mutantes auxotróficos de diferentes sorotipos de *Salmonella*, como é o caso de *Salmonella enterica*, sorotipos Typhi ou Typhimurium (CARDENAS e CLEMENTS, 1992) e *Shigella flexneri* (NORIEGA *et al.*, 1997). Dependendo do tipo de resposta imune necessária para prevenir a infecção por um patógeno de interesse, vetores de *Salmonella* viva atenuada codificando antígenos protetores heterólogos e podem induzir resposta imune relevante, sendo esta humoral, via mucosa ou mediada por células. Algumas mutações genéticas podem atenuar vários sorotipos de *Salmonella*, sendo uma das mais utilizadas a mutação *aroA*, que torna o microrganismo incapaz de sintetizar componentes aromáticos. Dessa forma a bactéria é incapaz de se reproduzir dentro do hospedeiro, mas ainda é capaz de invadir o intestino delgado e de persistir aí por um tempo longo o bastante para produzir e secretar concentrações de antígeno suficientes

para provocar uma resposta imune efetiva (CARDENAS e CLEMENTS, 1992). A localização do antígeno na bactéria carregadora e a apresentação adequada deste antígeno ao sistema imune são extremamente relevantes no acionamento da resposta imunológica desejada.

Com base no sistema de secreção da hemolisina, várias vacinas contra as bactérias intracelulares *Listeria monocytogenes* (HESS *et al.*, 1996), *Mycobacterium tuberculosis* (HESS *et al.*, 2000) e *Clostridium difficile* (RYAN *et al.*, 1997), e contra parasitas como *Theileria parva* (GENTSCHEV *et al.*, 1998) e *Plasmodium falciparum* (GÓMEZ-DUARTE *et al.*, 2001) e contra o vírus do sarampo (SPRENG *et al.*, 2000) foram desenvolvidas. Com finalidade de alcançar a expressão estável de antígenos heterólogos, uma das estratégias mais bem sucedidas, tanto para a expressão estável *in vivo* quanto para a secreção de proteínas recombinantes nestes vetores bacterianos, é o uso do sistema de secreção da α -hemolisina de *E. coli* (HlyA) para a veiculação de antígenos heterólogos em bactérias Gram-negativas com virulência atenuada (DIETRICH *et al.*, 2001; GENTSCHEV, 1996). Este sistema permite que a proteína inteira seja secretada para o meio extracelular, sem a formação de intermediários no espaço periplásmico, por meio de um vetor que é replicado de forma estável em diversas bactérias Gram-negativas, incluindo diferentes sorotipos atenuados de *Salmonella*, *Shigella spp.* e *Vibrio cholerae* (SPRENG *et al.*, 1999).

1.9 *Salmonella sp.*: Aspectos gerais e vetores vacinais

O gênero *Salmonella* é composto por duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *S. enterica* é composta por diversos sorotipos, entre eles o sorotipo Typhimurium. O gênero é caracterizado por bactérias em forma de bacilos, com diâmetro médio entre 0.7 a 1.5 μm e comprimento de 2 a 5 μm , Gram-negativas,

não-esporulantes, anaeróbias facultativas, que apresentam motilidade associada à presença de flagelos, e sendo proximamente relacionadas ao gênero *Escherichia* (SILVA *et al*, 2012).

A linhagem Typhimurium causa diversas infecções em pássaros e mamíferos, e pode causar intoxicação em humanos pelo consumo de alimentos contaminados. O sorotipo Typhi é o causador da febre tifóide em humanos. Para o desenvolvimento de vetores vacinais de *Salmonella*, diversas atenuações têm sido estudadas para a geração de linhagens apropriadas, principalmente dos sorotipos Typhi e Typhimurium. Essas atenuações devem fazer com que a bactéria não consiga se desenvolver no indivíduo vacinado e que o crescimento do vetor não aumente significativamente em indivíduos imuno-comprometidos. Em contrapartida, atenuações excessivas são indesejáveis, uma vez que podem comprometer a capacidade da bactéria vacinal de persistir nos tecidos e induzir uma imunidade protetora (MASTROENI *et al*, 2000). A linhagem utilizada nesse trabalho foi a *S. typhimurium* SL3261 e possui atenuação no gene *aroA*, que bloqueia a via sintética de compostos aromáticos.

A mutação no gene *aroA* interrompe a via biossintética de diversos compostos aromáticos nas células de *S. typhimurium*. Essas bactérias necessitam de ácido p-aminobenzóico (*pABa*) para sintetizar, por exemplo, 2,3-dihidroxibenzóico (DHB) e ácido fólico, precursores de compostos para aquisição de ferro da bactéria. A *Salmonella* sintetiza *pABa* e DHB de corismato, produto final da via de biosíntese de aromáticos (*aro*). O bloqueio em algum passo desta via torna a bactéria auxotrófica para dois componentes, os quais não são disponíveis em tecidos de vertebrados e, portanto, atenua a virulência (NAKAJIMA *et al*, 2004). Dessa forma, estes microrganismos se tornam promissores parceiros para desenvolvimento de vacinas recombinantes para diferentes patógenos.

1.10 Vacina Comercial SUIVAC – ERY IN

A vacina comercial SUIVAC ERY-IN foi utilizada nesse trabalho para a comparação da ação protetora produzida nos animais em relação às novas formulações testadas, uma vez que este é um dos produtos utilizados atualmente para profilaxia e controle dessa doença. O produto SUIVAC ERY-IN é uma vacina inativada contra erisipela suína. Cada 1 mL do produto contém: Princípios ativos: *Erysipelothrix rhusiopathiae inactivatum min. 1010,0* e Adjuvantes: *thiomersalum max. 0,1 mg; formaldehydum solutum max. 3,0 mg; saponinum guillaiae max. 0,05 mg; emulsio olei min. 0,15 mL; solvens ad 1 mL*. A dose em suínos é de 2 mL aplicados por injeção intramuscular. A dose testada em camundongos é de 1/50 desta dose, que corresponde a 40 µL. Esta vacina nos foi cedida pela empresa DYNTEC, da República Tcheca, para que pudéssemos realizar nossos estudos.

Assim, o ensaios comparativos usando proteína recombinante SpaA dentro ou não da *Salmonella* modificada em comparação a vacina comercial, poderá nos fornecer informações que possibilitem encontrar ferramentas a favor de uma vacina contra a erisipela suína, mais eficaz e menos nociva.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta imune induzida, em modelo murino, por duas vacinas experimentais contra erisipela suína, baseadas no antígeno SpaA de *E. rhusiopathiae*, e comparar os resultados obtidos com testes realizados com uma vacina comercial.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a produção de anticorpos nos animais imunizados e posteriormente infectados pela *E. rhusiopathiae*.
- Avaliar o perfil celular no sangue de animais imunizados e desafiados com *E. rhusiopathiae*.
- Comparar a capacidade imunizante das vacinas de vetor bacteriano vivo, de proteína purificada e da vacina comercial utilizada atualmente (microrganismo inativado), após desafio com *E. rhusiopathiae*.
- Analisar o padrão Th1/Th2 da resposta imunológica frente à resposta específica para *E. rhusiopathiae* utilizando o antígeno SpaA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas SPF (*specific pathogen free*) da linhagem BALB/c e da linhagem SWISS, com aproximadamente 4 semanas de idade provenientes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Morfologia e Patologia - UFSCar com livre acesso à água e alimento.

Os experimentos foram feitos com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar, atestada pelo protocolo nº. 064/13.

Em nossos estudos, utilizamos camundongos de duas diferentes linhagens: a linhagem SWISS, para estudar o possível efeito da imunização numa população mista e a linhagem BALB/c, que é isogênica, mostrando o efeito dessa imunização em apenas um padrão genético.

3.2 Microrganismos como vetores vacinais

Escherichia coli BL21(DE3)_spaA – utilizada para a expressão da proteína SpaA recombinante (Silva, 2011). A biomassa estocada, que continha a proteína de interesse, foi proveniente de um cultivo dessa linhagem de bactéria realizado em biorreator de 5L.

Salmonella enterica sorovar *Thyphimurium* SL3261 – genótipo (Lt2 *aroA*⁻); linhagem vacinal para camundongos, atenuada por mutação no gene *aroA*. Utilizada

para expressão das proteínas *in vivo*. A cepa foi cedida pela Dra. Elizabeth A. Martins do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, Sao Paulo-SP.

3.3 Preparação de estoque de células eletrocompetentes de *S. Typhimurium* SL3261

Inicialmente foi feito um inóculo da linhagem SL3261 em meio 2YT (triptona 16 g/L, extrato de levedura 10 g/L, NaCl 5 g/L), sendo incubado a 37°C e 170 rpm por uma noite. Após essa etapa, alíquotas da cultura foram diluídas em meio fresco de modo a obter densidade ótica (DO_{600nm}) de 0,1, e a partir daí incubadas novamente nas mesmas condições de crescimento até atingirem DO = 0,4. Em seguida, foi feita centrifugação de 80 mL da cultura a 4000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20 mL de solução de glicerol 10% (v/v). Foi realizada nova centrifugação e essa etapa de lavagem das células (ressuspensão em glicerol seguida de centrifugação) foi repetida mais 4 vezes, com volumes decrescentes de solução de glicerol: 2 lavagens com 10 mL, 1 lavagem com 5 mL e a última lavagem com 1 mL. O *pellet* final foi então ressuspensado em 100 µL de glicerol 10 %, e a suspensão foi armazenada a -80°C em duas alíquotas de 50 µL.

3.4 Transformação por eletroporação e confirmação dos clones de *S. Typhimurium* SL3261 recombinante

O estoque de células eletrocompetentes foi descongelado em banho de gelo e incubado com aproximadamente 100 ng do DNA de interesse (pMOhly1_ *spaA*) (SILVA, 2011). Em seguida, a mistura de células e DNA foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 0,2 mm de distância entre os eletrodos e foi feita a descarga

do pulso elétrico de 25 μ F de capacitância, 2,5 KV e 200 Ohms de resistência (eletroporador Bio-Rad, modelo Gene Pulser). Imediatamente após o pulso, foram adicionados 400 μ L de meio SOC à cubeta, e a suspensão foi transferida para um tubo de 1,5 mL, a fim de ser incubada por 1 hora a 37°C e 170 rpm. Após isso, foi feito o plaqueamento de alíquotas de 200 μ L da cultura em placas de 2YT ágar com ampicilina 100 μ g/mL, que foram então incubadas a 37°C por 16 horas. Algumas colônias crescidas no meio seletivo foram inoculadas em meio líquido 2YT contendo ampicilina 100 μ g/mL e incubadas a 37°C e 170 rpm, por uma noite.

3.5 Confirmação da linhagem de células *S. typhimurium* SL3261 transformadas com a construção pMOhly1_ *spaA*

Foi realizada reação de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) em termociclador (Px2 Thermal Cycler – Thermo) tendo como molde o DNA extraído diretamente das colônias cultivadas (PCR de colônia) para verificação da presença da construção pMOhly1_ *spaA* (plasmídeo inserido nas células de *Salmonella* para expressão do fragmento do antígeno SpaA de *E. rhusiopathiae*).

Nessa reação foi utilizado o oligonucleotídeo iniciador direto “*Fow Seq pMOI*” (que se hibridiza com o plasmídeo pMOhly1 na região *upstream* ao sítio de clonagem *NotI*) e o oligonucleotídeo iniciador reverso “*Rev SpaA_NotI*” (que se hibridiza à extremidade 3’ do fragmento do gene *spaA*). A sequência dos oligonucleotídeos está descrita em Silva, 2011.

Cada reação, para volume total de 50 μ L, continha:

- molde (suspensão contendo uma colônia em 50 μ L de água): 1 μ L
- tampão (Tris-HCl 750 mM, (NH₄)₂SO₄ 200 mM, Tween 20 0,1%, pH 8,8): 5 μ L
- MgCl₂ 25 mM: 4 μ L

- oligonucleotídeos direto e reverso 10 μ M (cada): 1 μ L de cada
- dNTPs 10 mM: 1 μ L
- água: 36 μ L
- Taq DNA polimerase 5 U/ μ L (Fermentas): 1 μ L

Após desnaturação inicial da dupla fita do DNA molde por 5 minutos a 94°C, foram realizados 30 ciclos com 1 minuto de desnaturação a 94°C, hibridização dos oligonucleotídeos com a fita molde a 50°C por 1 minuto, e extensão das novas fitas de DNA a 72°C por 3 minutos. A extensão final foi feita a 72°C por 10 minutos. O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1 %.

A presença da construção pMOhly1_ *spaA* nas células analisadas foi confirmada pela visualização de uma banda de aproximadamente 1000 pb no gel de agarose.

3.6 Preparação da vacina de vetor bacteriano vivo

As células de *S. typhimurium* SL3261, transformadas com plasmídeo recombinante pMOhly1_ *spaA* foram cultivadas e logo após centrifugadas a 3500 g por 15 min a 20 °C. Em seguida foram ressuspensas em NaCl 0.9 %.As doses da vacina foram de 0,5 mL contendo 1×10^{10} UFC e foram administradas via intragástrica.

3.7 Purificação da proteína rSpaA da *E. coli*

As células de *E. coli* recombinante foram ressuspensas no tampão de ligação com guanidina 6M. Após a ressuspensão, foram agitadas por uma hora a temperatura ambiente. Centrifugou-se a 10000g durante 15 minutos. Sonicou-se a suspensão com 6 pulsos por 1 min com 30 segundos de intervalo. A suspensão resultante foi filtrada com poro de 0,22 μ m. Em seguida, a solução foi injetada na coluna de níquel pré-tratada, na

vazão de 1 mL por minuto. Lavou-se a coluna com tampão ligação. Foram feitas seguidas lavagens com tampão de lavagem pH 8, pH 6,3 e a eluição com pH 4,5. Após a eluição, a proteína purificada foi mantida no congelador até a preparação da vacina. A quantificação da proteína foi feita pelo método de Bradford, utilizando 1 mL do reagente Bradford com 20 µL da amostra de proteína incubada à temperatura ambiente por 5 minutos, e fazendo a leitura a 595 nm.

3.8 Preparação da vacina de proteína rSpaA purificada

O procedimento para a preparação da vacina consiste na adição de 50 µg de proteína recombinante purificada ao adjuvante (SHIMOJI *et al.*, 1999). A dose da vacina é feita na proporção de 1:1. Adiciona-se a 50 µL de hidróxido de alumínio (adjuvante), 50 µg de proteína purificada diluída em 50 µL de tampão de eluição com pH 4,5.

3.9 Administrações das vacinas aos camundongos

Foram feitos dois experimentos independentes. No primeiro, usamos a linhagem SWISS e tivemos 4 grupos: controle, infectado (recebeu somente a dose da *Erysipelothrix rhusiopathiae*), grupo vacinado com a proteína purificada e posteriormente infectado e o grupo vacinado com a comercial posteriormente infectado. No segundo, usamos a linhagem BALB/c e tivemos os mesmos 4 grupos do primeiro, além do grupo da vacina de vetor bacteriano vivo, em que foi usada a linhagem vacinal SL3261.

Os animais foram divididos em cinco grupos (N=8 a 14):

- **Grupo 1:** receberam apenas uma dose de 0,5 mL de bicarbonato de sódio 0,05 M compH 9,6.
- **Grupo 2:** apenas infectados com *E. rhusiopathiae*.
- **Grupo 3:** receberam 50µg de proteína purificada (com adjuvante) e foram desafiados com *E. rhusiopathiae*.
- **Grupo 4:** receberam $1,0 \times 10^{10}$ UFC da linhagem vacinal *S. typhimurium* SL3261 transformada com plasmídeo recombinante pMOhly1_ *spaA* e foram desafiados com *E. rhusiopathiae*.
- **Grupo 5:** receberam a dose da vacina comercial e foram desafiados com *E. rhusiopathiae*.

As inoculações do grupo 4 foram sempre precedidas de doses de 0,5 mL de bicarbonato de sódio 0,05 M pH 9,6. No caso da vacina de vetor bacteriano vivo, o esquema de vacinação é composto por 3 doses, via intragástrica, com intervalo de 21 dias entre a 1ª e 2ª dose e 14 dias entre a 2ª e 3ª dose. Foi usada uma cânula apropriada para a realização da gavagem. O esquema de vacinação da vacina de proteína purificada é composto por 2 doses com um intervalo de 21 dias entre elas. A via é intramuscular.

3.10 Infecção dos camundongos com *Erysipelothrix rhusiopathiae*

A infecção dos camundongos foi feita com uma dose de $1,02 \times 10^3$ UFC, em um volume de 0,5 mL da linhagem virulenta da bactéria *Erysipelothrix rhusiopathiae* (NCTC11002), 14 dias após a administração da última dose de cada uma das diferentes vacinas, por injeção intraperitoneal. As células foram ressuspensas em solução salina (NaCl 0,9 %) para o procedimento.

3.11 Obtenção das células do sangue

O sangue foi retirado por punção cardíaca utilizando-se seringas de 1 mL. A contagem global foi feita em câmara de Neubauer no momento da retirada do sangue. A contagem diferencial de células foi feita em esfregaços sanguíneos preparados no momento da punção. O soro foi separado por centrifugação a 8000 rpm por 15 minutos a 4°C e transferido para tubos de 1,5 mL com tampa, para armazenamento a -20°C.

3.12 Análise de anticorpos (ELISA) IgG total, IgG1 e IgG2a

As amostras de soro dos animais foram analisadas por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para análise da produção de anticorpos específicos contra o antígeno rSpaA de *E. rhusiopathiae*. Os experimentos foram realizados em triplicata e foi feita a titulação do anticorpo IgG, além das subclasses IgG1 e IgG2a para avaliar a tendência Th1/Th2 da resposta induzida.

As placas de 96 poços (Costar – Corning) foram sensibilizadas com 100 µL/poço de rSpaA purificada e diluída em tampão carbonato (0,1 µg rSpaA/100 µL de tampão), e incubadas por uma noite a 4°C. A seguir, as placas foram lavadas 3 vezes com PBST e foi feito o bloqueio com 200 µL/poço de solução de BSA (soro albumina bovina) 1,0 % (m/v) em PBST por 2 horas a 37°C. Após nova lavagem, volumes de 100 µL/poço das amostras foram aplicados. As placas foram incubadas novamente a 37°C por um período de 1 a 2 horas, e passaram por nova etapa de lavagem. Foi então feita a incubação com 100 µL/poço do anticorpo secundário anti-mouse IgG conjugado a peroxidase, diluído 1:5000, para as análises de IgG total. Os anticorpos anti-mouse IgG1 ou IgG2a foram diluídos 1:2000, para as análises das subclasses. As placas foram incubadas por mais 1 hora a 37°C e lavadas em seguida. Por fim, foi feita a revelação com 50 µL/poço da solução de revelação por 30 minutos no escuro e a

temperatura ambiente. As reações foram finalizadas com a adição de 50 μL /poço de solução de H_2SO_4 1,0 M, e foi feita a leitura de absorbância das amostras em comprimento de onda de 490 nm.

As análises foram realizadas no Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) gerenciado pela Professora Doutora Lúcia Helena Faccioli. Os ensaios foram realizados com a supervisão da técnica responsável Alyne Favero Galvão.

3.12.1 Soluções utilizadas no ELISA

Tampão carbonato (pH 9,6):

NaHCO_3 – 2,93 g/L

Na_2CO_3 – 1,59 g/L

Timerosal 0,1 g/L

Tampão PBST (pH 7,4):

NaCl – 8,0 g/L

KCl – 0,2 g/L

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 3,58 g/L

KH_2PO_4 – 0,24 g/L

Tween 20 – 0.05 %

Tampão de revelação (pH 5,0):

Ácido cítrico 0,1 M – 4,9 mL

Na_2HPO_4 0,2 M – 5,1 mL

Água destilada – 10 mL

Solução de revelação:

5 mg de OPD (o-dihidroclorato de fenilenediamina)

10 L tampão de revelação

5 μ L H₂O₂ 30 % (v/v)

3.13 Análise da produção de IL-4 e IL-12 por ELISA

Foi realizada a dosagem das Interleucinas IL-4 e IL-12 através do ensaio imunoenzimático ELISA. Para isso foram utilizados os Kits de detecção da R&D Systems® (mouse IL-4 e mouse IL-12) seguindo os procedimentos de acordo com o fabricante. Para essa análise, foi realizado um *pool* de amostras (soro dos animais do mesmo grupo misturados, formando apenas uma amostra) e testado em triplicata.

Para a realização do ELISA, utilizaram-se placas de microtitulação com 96 poços. Primeiramente, as placas foram sensibilizadas com 100 μ L/poço de solução contendo o anticorpo de captura em uma concentração de 4 μ g/mL diluído em PBS (anti-IL4 e anti-IL-12). As placas foram incubadas por 18 horas a 4°C. Após este período as placas foram lavadas duas vezes com solução 0,05% Tween 20 em PBS e uma vez em PBS e adicionado 300 μ L de 1% Soro Bovino Fetal em PBS para bloqueio dos sítios de ligações inespecíficos. Após uma hora de incubação em temperatura ambiente, as placas foram lavadas. A seguir foi adicionado o padrão com as respectivas diluições das citocinas recombinantes e as amostras (100 μ L/poço). A primeira concentração da citocina recombinante foi de 2000 pg/mL para IL-12 e 1000 pg/mL para IL-4, sucessivamente diluídas na base de 2 por 12 vezes em 1% Soro Bovino Fetal em PBS. Após incubação em temperatura ambiente por 2 horas, foi realizada a lavagem

das placas e adicionado 100 μ L de anticorpo de detecção (anticorpo secundário biotilado 400 ng/mL para IL-12 e IL-4), ficando incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. As placas foram lavadas e incubadas por 20 minutos contendo 100 μ L/poço da enzima Estreptoavidina-HRP diluída em 1% Soro Bovino Fetal em PBS (1:1000). Após lavagem das placas, foram adicionados 100 μ L de Substrato 1:1 de H₂O₂ e Tetrametilbenzidina (TMB), que ficaram incubadas por mais 20 minutos. Para finalizar, a reação foi bloqueada adicionando 50 μ L/poço de Solução Stop (2N H₂SO₄). A leitura da absorbância foi feita no comprimento de onda de 450 nm em leitor de placas μ Quant.

As análises foram realizadas no Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) gerenciado pela Professora Doutora Lúcia Helena Faccioli. Os ensaios foram realizados com a supervisão da técnica responsável Alyne Favero Galvão.

3.14 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos em tabelas descritas em editor de texto (Microsoft Word) e os gráficos dispostos no programa GraphPad Prism, onde os grupos foram comparados. As análises foram dispostas em resultados expressos com média \pm EPM. Os resultados obtidos nos diferentes experimentos foram submetidos ao método de análise de variância ANOVA, com pós-teste de Tukey. Para análise estatística foi utilizado o programa GraphPad InStat (San Diego, Califórnia, USA). A significância estatística foi estabelecida em valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Administração da vacina de subunidade composta pela proteína purificada acrescida de hidróxido de alumínio (adjuvante) e infecção com 50xDL50 (desafio)

Os resultados do nosso primeiro experimento mostram os dados de um tipo de abordagem já descrita na literatura, em que se verifica a capacidade da proteína recombinante, acrescida de um adjuvante, em desempenhar o papel de agente imunogênico. O teste consiste na imunização dos animais BALB/c com a vacina de proteína purificada e posterior infecção pela *Erysipelothrix rhusiopathiae*, com uma dose de 50 vezes a DL50 (esta levaria a óbito 50% dos animais infectados). Ou seja, os animais foram desafiados com uma superdose de bactéria.

Segundo a figura 1, os animais do grupo controle permaneceram vivos, todos os animais do grupo apenas infectado foram a óbito ao final do terceiro dia e o grupo vacinado, e depois infectado, teve uma taxa de sobrevivência de 50%.

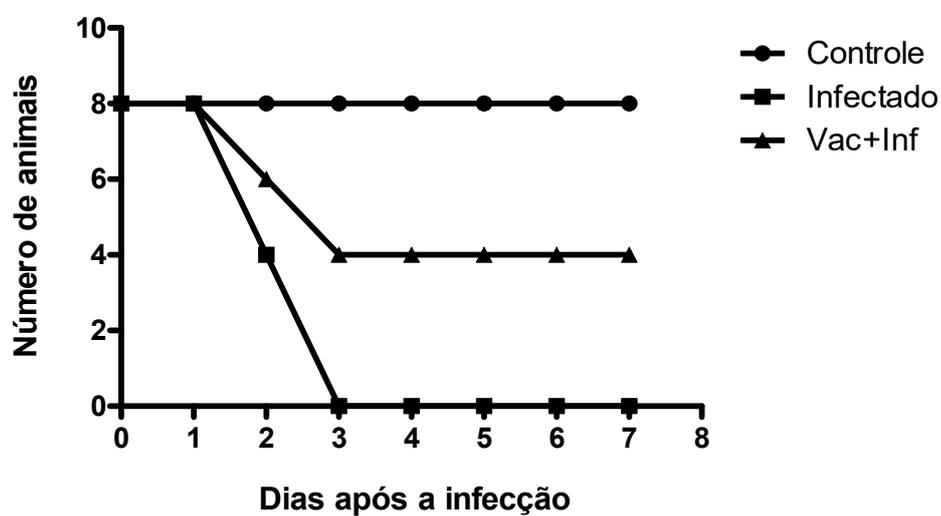


Figura 1: Curva de sobrevivência dos animais dos grupos controle (círculo), apenas infectado (quadrado) e vacinado com proteína purificada + infecção (triângulo), com n=8. Dados obtidos ao longo de 8 dias após a infecção.

4.2 Tabelas de sobrevivência

As tabelas 1 e 2 indicam o total de animais utilizados, a quantidade de animais que vieram a óbito e a porcentagem de sobreviventes, ao final dos experimentos de forma independente.

Grupo	Total de animais	Óbitos	Sobreviventes (%)
Controle	10	0	100%
Infectado	10	0	100%
Vac. Prot. Purificada	10	0	100%
Vac. Comercial	10	0	100%

Tabela 1: Dados do primeiro experimento (animais Swiss), onde são demonstradas as porcentagens de sobrevivência dos animais vacinados.

Grupo	Total de animais	Óbitos	Sobreviventes (%)
Controle	8	0	100%
Infectado	8	6	25%
Vac. Prot. Purificada	14	0	100%
Vac. Comercial	14	1	92,85%
Vac. <i>Salmonella</i>	14	7	50%

Tabela 2: Dados do segundo experimento (animais BALB/c), onde são demonstradas as porcentagens de sobrevivência dos animais vacinados.

4.3 Perfil de leucócitos no sangue - animais heterogênicos

Nesse experimento utilizou-se a dose que corresponde a DL50 ($1,02 \times 10^3$ UFC) de *E. rhusiopathiae* com o objetivo de avaliar a resposta celular à infecção no sangue, de animais imunizados ou não com as vacinas. E ainda, analisou-se o recrutamento celular e classificaram-se os tipos celulares envolvidos na resposta imune celular contra a infecção em: células mononucleares, eosinófilos e neutrófilos após a imunização e posterior infecção por *E. rhusiopathiae*.

4.3.1 Contagem de células totais no sangue de animais imunizados com vacina de proteína purificada ou vacina comercial e desafiados ou não com *Erysipelothrix rhusiopathiae*

A figura 2 representa a contagem de células totais no sangue dos animais estudados. Observamos que, os animais infectados com *E. rhusiopathiae* apresentaram aumento de leucócitos totais em relação ao grupo controle e os animais que receberam a imunização, apresentaram diminuição dessas células quando comparados ao grupo apenas infectado (fig 2).

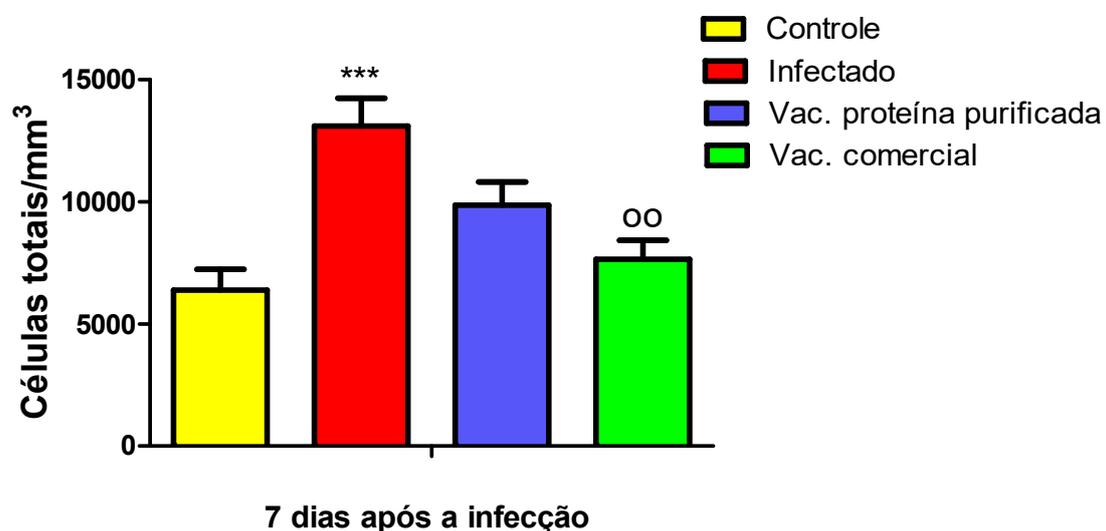


Figura 2: Contagem total de células no sangue de animais heterogênicos, 7 dias após a infecção. Células totais/mm³. Os dados representam a média ± EPM (n = 10 animais). * p < 0,05 representam a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo Infectado quando comparado com o grupo Controle. ° p < 0,05 representam a diferença significativa dos grupos Vacina de proteína purificada e Vacina comercial quando comparados com o grupo Infectado, usando o teste não paramétrico One-way ANOVA.

4.3.2. Contagem diferencial de células no sangue de animais imunizados com vacina de proteína purificada ou vacina comercial e desafiados ou não com *Erysipelothrix rhusiopathiae*

A figura 3 representa a avaliação do recrutamento celular após a imunização, classificando os tipos celulares envolvidos na resposta imune em: neutrófilos (fig 3A), células mononucleares (fig 3B) e eosinófilos (fig 3C). Observamos que a imunização, tanto com a vacina de proteína purificada, como a vacina comercial foi capaz de modular o recrutamento de neutrófilos e eosinófilos promovendo diminuição dessas células no sangue periférico dos animais imunizados e desafiados com *E. rhusiopathiae* (fig 3).

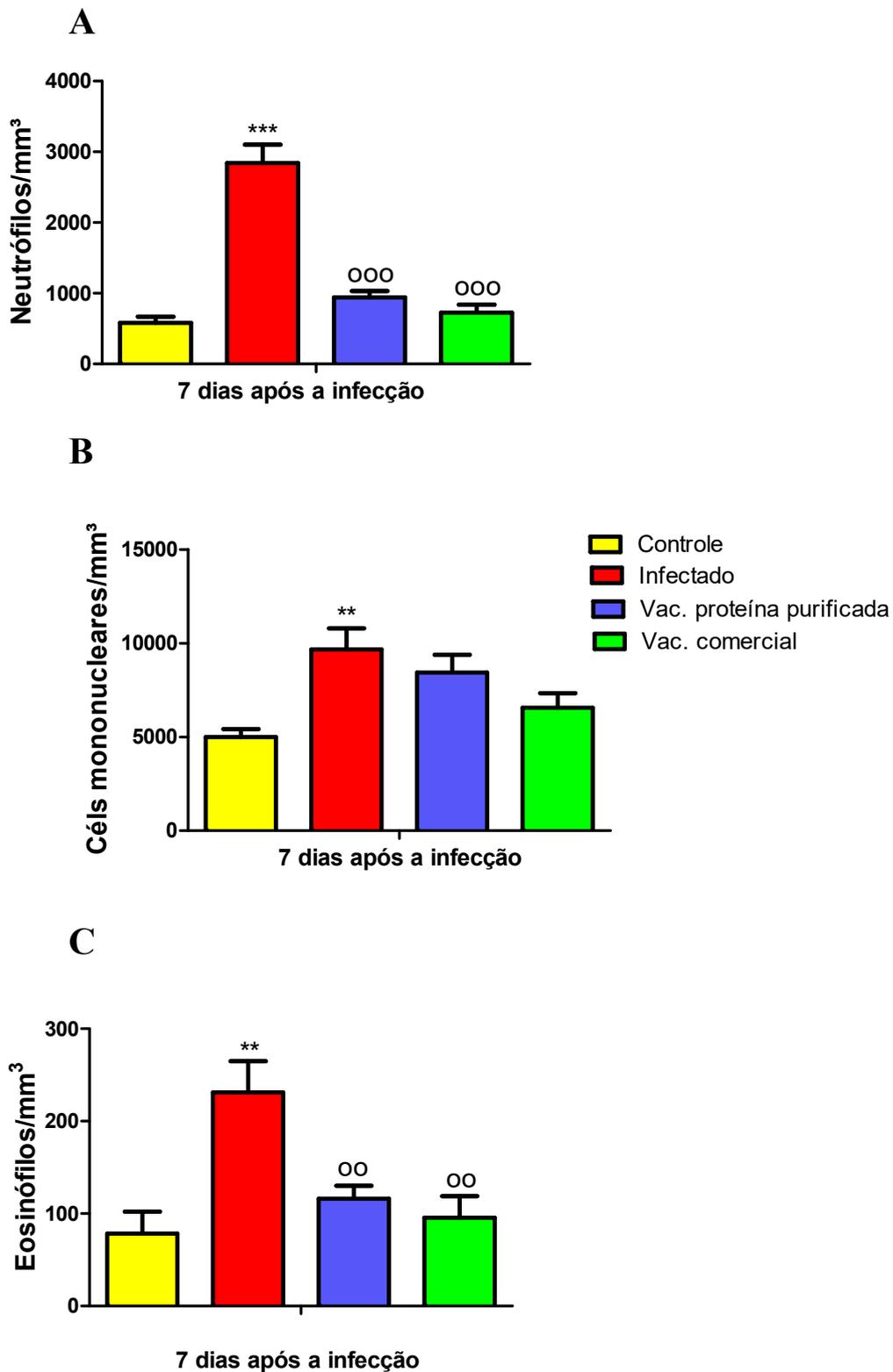


Figura 3: Contagem de neutrófilos, células mononucleares e eosinófilos no sangue de animais heterogênicos, 7 dias após a infecção. Os dados representam a média \pm EPM (n = 10 animais). * $p < 0,05$ representam a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo Infectado quando comparado com o grupo Controle. ° $p < 0,05$ representam a diferença significativa dos grupos Vacina de proteína purificada e Vacina comercial quando comparados com o grupo Infectado, usando o teste não paramétrico One-way ANOVA.

4.4 Perfil de leucócitos no sangue - animais isogênicos

Nesse experimento também se utilizou a dose que corresponde a DL50 ($1,02 \times 10^3$ UFC) de *E. rhusiopathiae*. Com o objetivo de avaliar a resposta celular à infecção, no sangue, em animais imunizados ou não com as vacinas, analisou-se o recrutamento celular e classificou-se os tipos celulares envolvidos na resposta imune celular contra a infecção, em células mononucleares, eosinófilos e neutrófilos após a imunização e posterior infecção por *E. rhusiopathiae* em animais BALB/c.

4.4.1 Contagem de células totais no sangue de animais imunizados com vacina de proteína purificada, vacina de *Salmonella* recombinante ou vacina comercial e desafiados ou não com *Erysipelothrix rhusiopathiae*

A figura 4 representa a contagem de células totais no sangue dos animais. Observamos que, os animais infectados com *E. rhusiopathiae* apresentaram aumento de leucócitos totais em relação ao grupo controle e os animais que receberam a imunização, apresentaram diminuição dessas células em relação ao grupo apenas infectado.

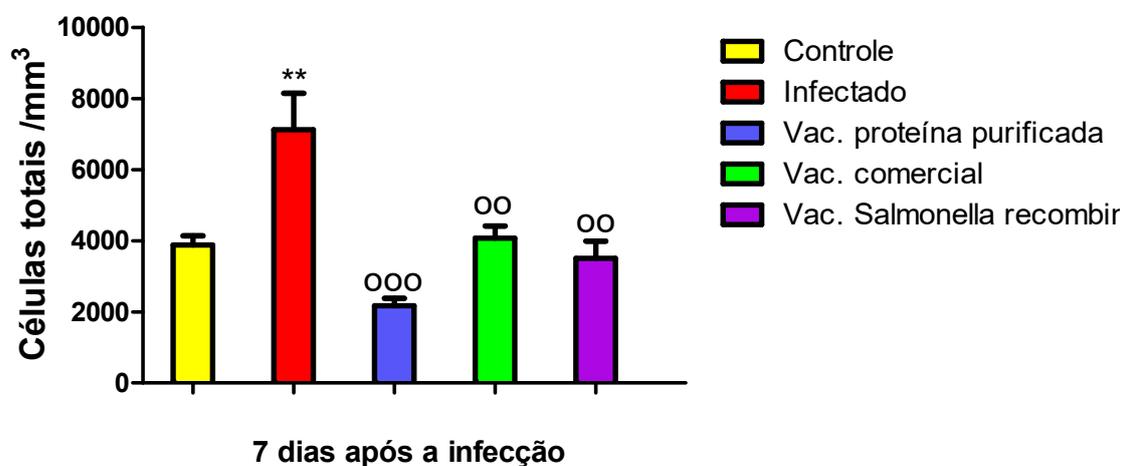


Figura 4: Contagem total de células no sangue de animais isogênicos, 7 dias após a infecção. Células totais/mm³. Os dados representam a média ± EPM (n = 8-14 animais). * p < 0,05 representam a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo Infectado quando comparado com o grupo Controle. ° p < 0,05 representam a diferença significativa dos grupos Vacina de proteína purificada, Vacina de *Salmonella* recombinante e Vacina comercial quando comparados com o grupo Infectado, usando o teste não paramétrico One-way ANOVA.

4.4.2. Contagem diferencial de células no sangue de animais imunizados com vacina de proteína purificada, vacina de *Salmonella* recombinante ou vacina comercial e desafiados ou não com *Erysipelothrix rhusiopathiae*

Os gráficos da figura 5 a seguir, representam a distribuição dos 3 tipos de leucócitos analisados. Observamos que as imunizações, com a vacina de proteína purificada, com a vacina de *Salmonella* recombinante e com a vacina comercial, foram capazes de modular o recrutamento de neutrófilos (fig 5A), células mononucleares (fig 5B) e eosinófilos (fig 5C), promovendo diminuição dessas células no sangue periférico dos animais imunizados e desafiados com *E. rhusiopathiae*.

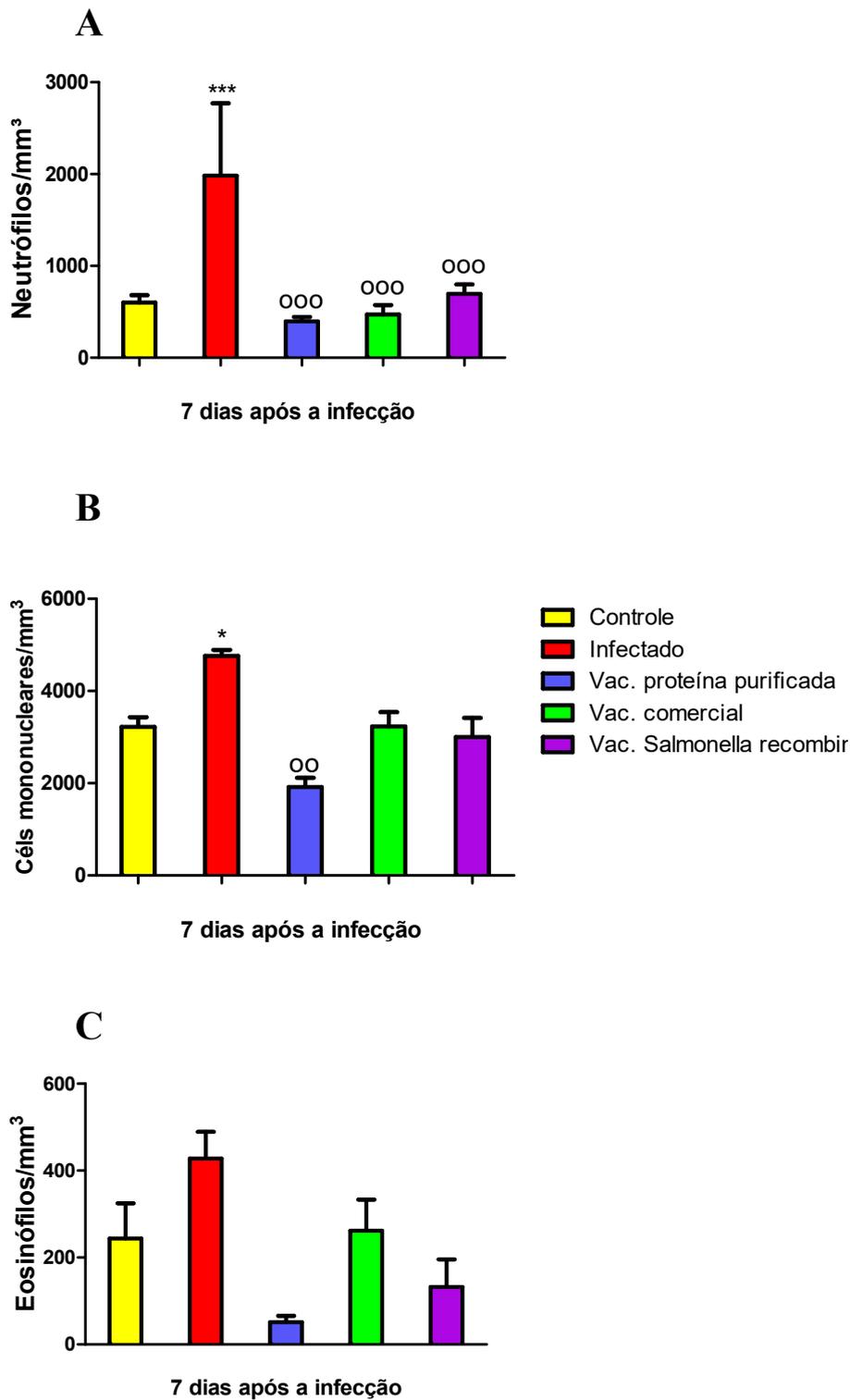


Figura 5: Contagem de neutrófilos, células mononucleares e eosinófilos no sangue de animais isogênicos, 7 dias após a infecção. Os dados representam a média \pm EPM (n = 8-14 animais). * $p < 0,05$ representam a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo Infectado quando comparado com o grupo Controle. ° $p < 0,05$ representam a diferença significativa dos grupos Vacina de proteína purificada, Vacina comercial e Vacina de *Salmonella* recombinante quando comparados com o grupo Infectado, usando o teste não paramétrico One-way ANOVA.

4.5 Produção de IgGtotal, IgG1 e IgG2a nos diferentes grupos

O soro dos animais dos diferentes grupos experimentais foi analisado quanto à presença de anticorpos específicos anti-rSpaA.

4.5.1 Análise da produção de anticorpos - animais heterogênicos

Os gráficos da figura 6 mostram a produção de IgGtotal, IgG1 e IgG2a nos diferentes grupos experimentais. Observa-se uma maior produção dessas classes de imunoglobulinas nos animais imunizados com a vacina de proteína purificada.

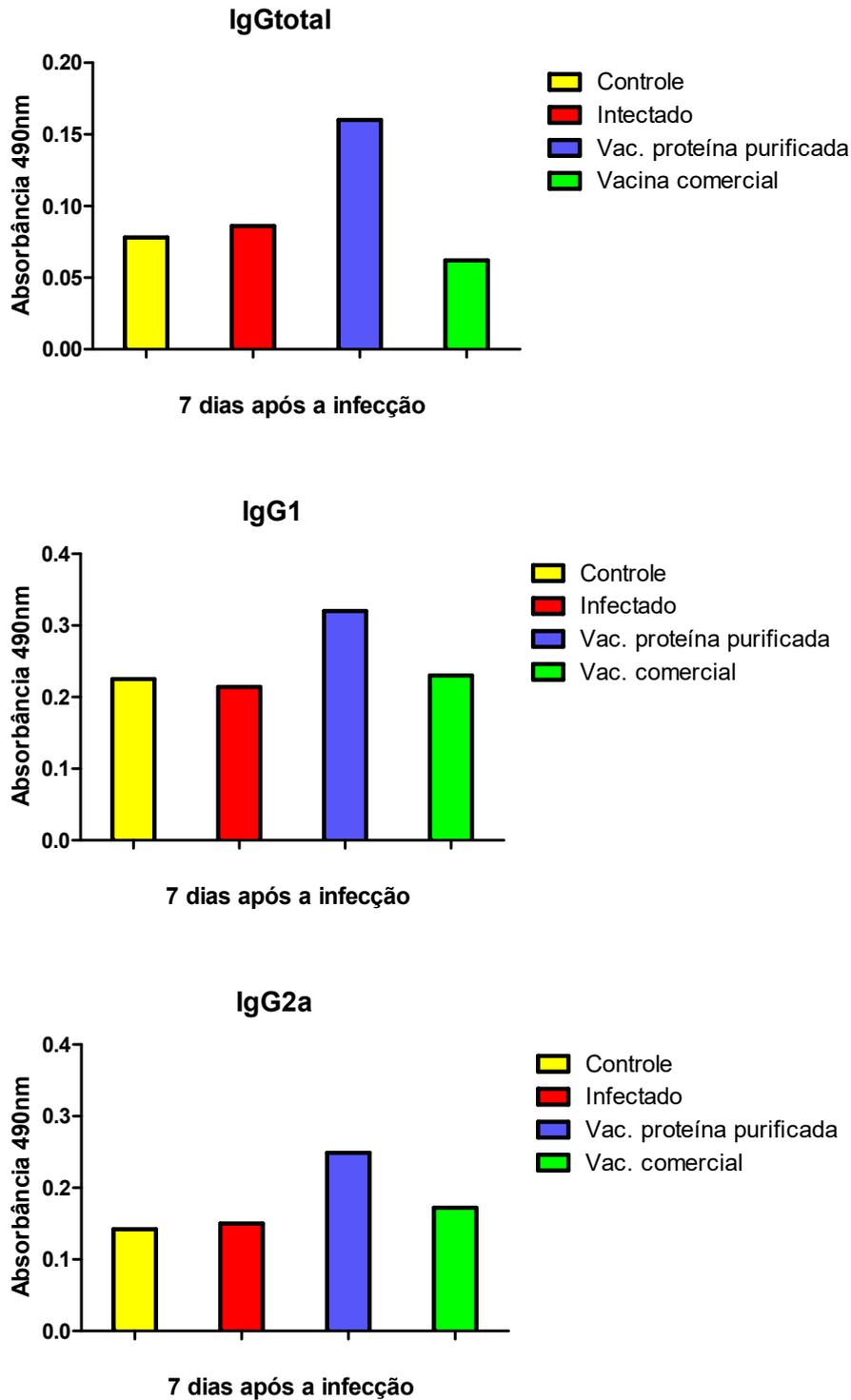


Figura 6: Título de IgGtotal, IgG1 e IgG2a no sangue de animais heterogênicos, 7 dias após a infecção. Os dados representam a média \pm EPM (n = 10 animais). $^{\circ}$ $p < 0,05$ representam a diferença significativa dos grupos Vacina de proteína purificada e Vacina comercial, quando comparados com o grupo controle, usando o teste não paramétrico One-way ANOVA.

4.5.2 Análise da produção de anticorpos - animais isogênicos

Os gráficos da figura 7 mostram a produção de IgGtotal, IgG1 e IgG2a nos diferentes grupos experimentais. Observa-se uma maior produção dessas classes de imunoglobulinas também pela vacina de proteína purificada. No caso da IgG2a, a vacina de *Salmonella* também mostrou maior produção em relação aos outros grupos.

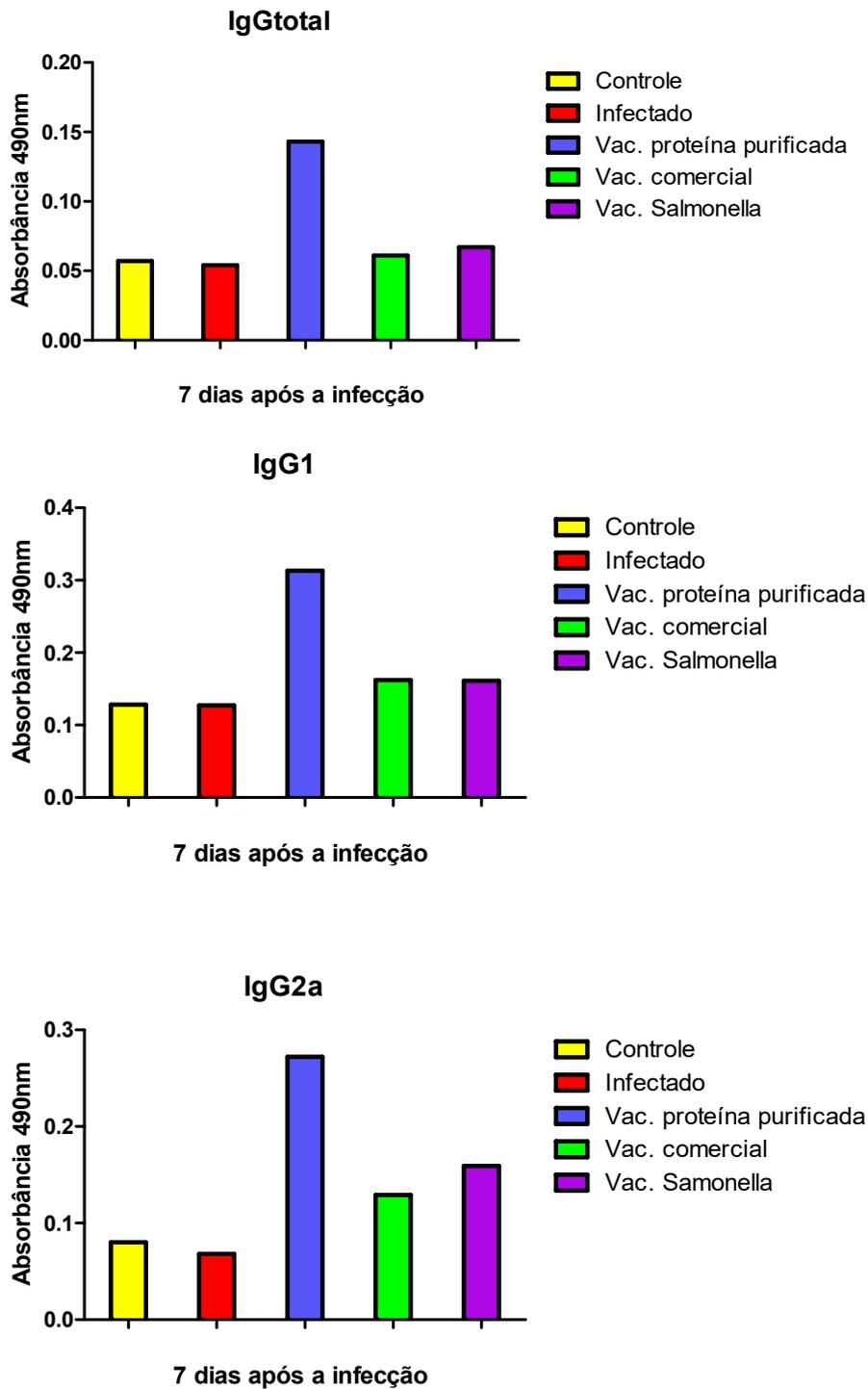


Figura 7: Títulos de IgGtotal, IgG1 e IgG2a no sangue de animais isogênicos, 7 dias após a infecção. Os dados representam a média \pm EPM (n = 8-14 animais). $^{\circ}$ $p < 0,05$ representam a diferença significativa dos grupos Vacina de proteína purificada, Vacina de *Salmonella* recombinante e Vacina comercial, quando comparados com o grupo controle, usando o teste não paramétrico One-way ANOVA.

4.6 Produção de IL-4 e IL-12 nos diferentes grupos

O soro dos animais dos diferentes grupos experimentais foi analisado quanto à produção das citocinas IL-4 e IL-12.

4.6.1 Análise da produção de IL-4 e IL-12 - animais heterogênicos

Os gráficos da figura 8 mostram a produção de IL-4 e IL-12 nos diferentes grupos experimentais. Observa-se uma produção significativa da IL-4 tanto pela vacina de proteína purificada, quanto pela vacina comercial, quando comparadas ao grupo controle.

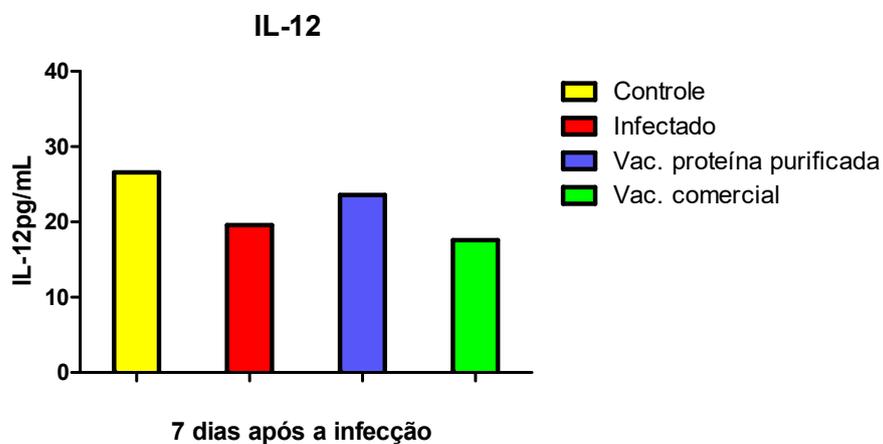
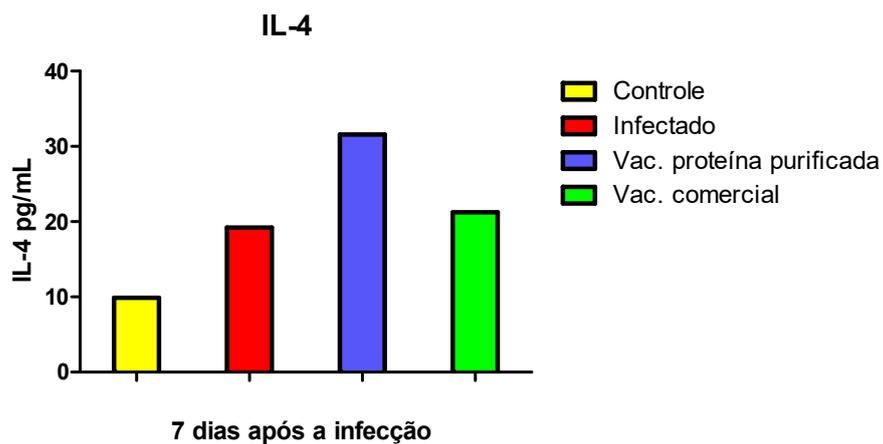


Figura 8: Concentração de IL-4 e IL-12 no sangue de animais heterogênicos, 7 dias após a infecção. Os dados representam a média \pm EPM (n = 10 animais). $^{\circ}$ $p < 0,05$ representam a diferença significativa dos grupos Vacina de proteína purificada e Vacina comercial, quando comparados com o grupo controle, usando o teste não paramétrico One-way ANOVA.

4.6.2 Análise da produção de IL-4 e IL-12 - animais isogênicos

Os gráficos da figura 9 mostram a produção de IL-4 e IL-12 nos diferentes grupos experimentais. Observa-se um aumento na produção dessas citocinas pela vacina de proteína purificada, pela vacina comercial e pela vacina de *Salmonella* quando comparadas ao grupo controle.

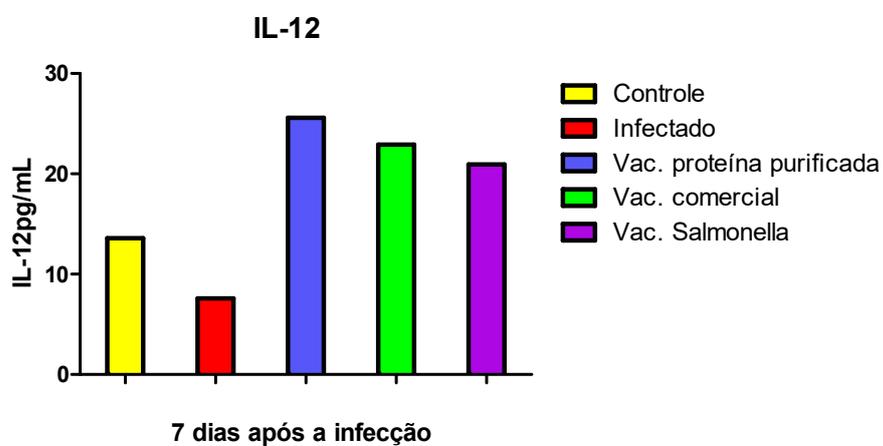
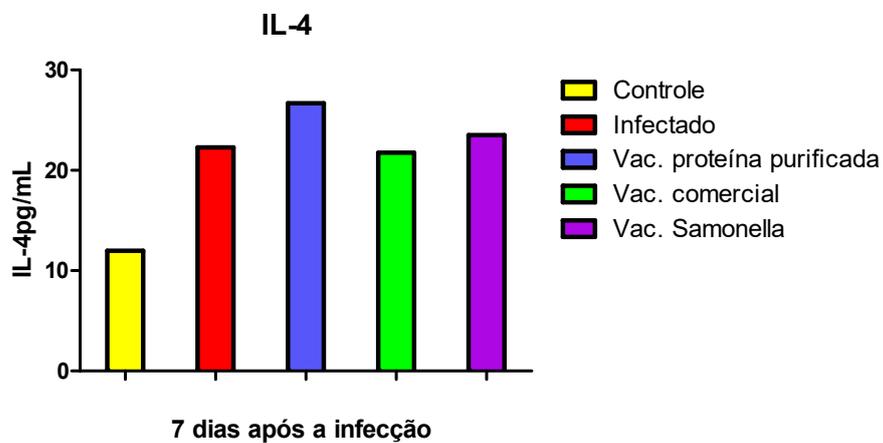


Figura 9: Concentração de IL-4 e IL-12 no sangue de animais isogênicos, 7 dias após a infecção. Os dados representam a média \pm EPM (n = 8-14 animais). $^{\circ}$ $p < 0,05$ representam a diferença significativa dos grupos Vacina de proteína purificada, Vacina de *Salmonella* recombinante e Vacina comercial, quando comparados com o grupo controle, usando o teste não paramétrico One-way ANOVA.

4.7 Comparação entre os títulos de imunoglobulinas produzidas pelas diferentes vacinas

Os gráficos da figura 10 representam a comparação entre os títulos de imunoglobulinas produzidas pelas três vacinas testadas, no primeiro e no segundo experimento. Observamos a maior produção, em ambos os experimentos, nos animais do grupo - vacina de proteína purificada.

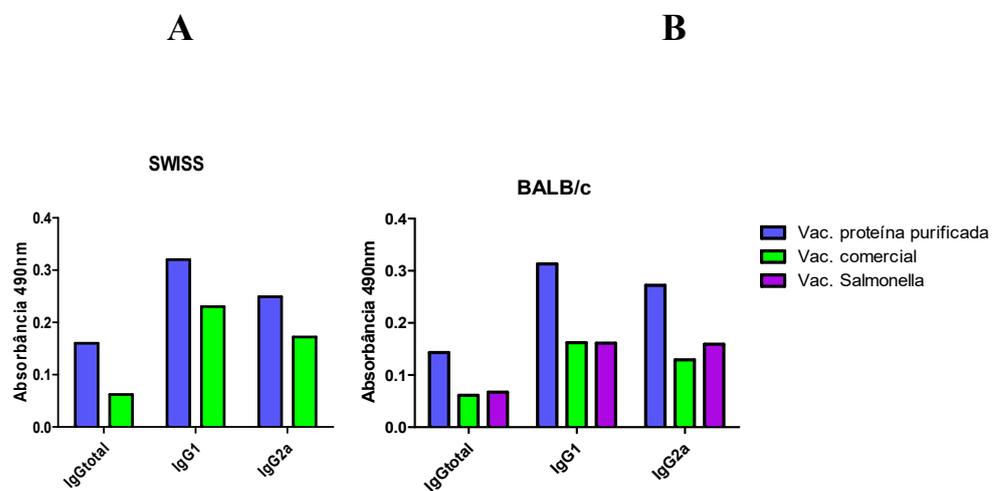


Figura 10: Produção de IgG medido por ELISA em dois experimentos independentes.
A) Imunoglobulinas produzidas por animais da linhagem SWISS (heterogênicos); B) Imunoglobulinas produzidas por animais da linhagem BALB/c (isogênicos).

4.8 Comparação entre os títulos de interleucinas produzidas pelas diferentes vacinas

Os gráficos da figura 11 representam a comparação na produção de interleucinas após a imunização pelas três vacinas testadas. Observamos a maior produção, em ambos os experimentos, nos animais do grupo - vacina de proteína purificada, embora não haja diferença significativa desses títulos em comparação com as outras vacinas, observa-se efeito biológico da vacina de proteína purificada.

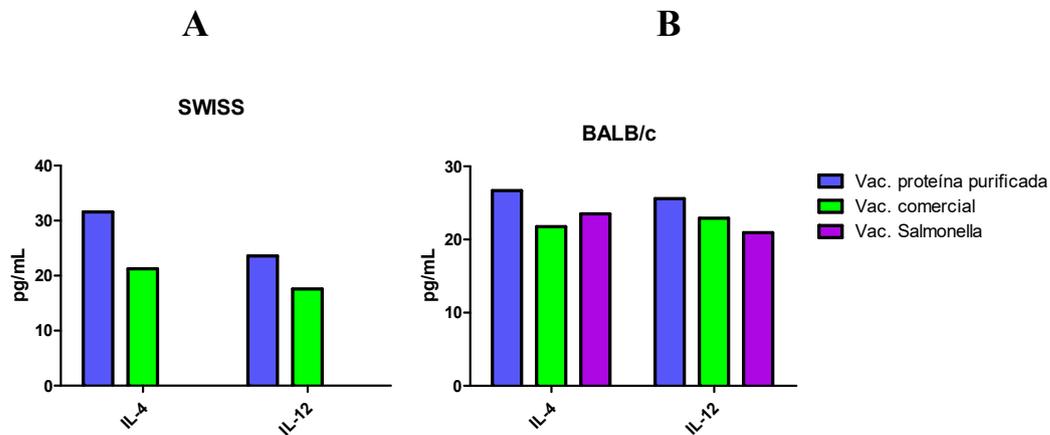


Figura 11: IL-4 e IL-12 medidos por ELISA em pg/mL em dois experimentos independentes. A) Interleucinas produzidas por animais da linhagem SWISS (heterogênicos); B) Interleucinas produzidas por animais da linhagem BALB/c (isogênicos).

5. DISCUSSÃO

A erisipela suína é uma doença infectocontagiosa do tipo hemorrágica, caracterizada por lesões cutâneas, articulares, cardíacas ou septicemia, além de causar aborto, por bactérias do gênero *Erysipelothrix* spp. As bactérias resistem várias semanas na água e no solo em pH alcalino, sobrevivendo vários meses em matéria orgânica em decomposição. Essa bactéria é capaz de sobreviver por um longo período de tempo no ambiente, se adaptando a uma grande faixa de temperatura e até a ambientes marinhos. Suínos de todas as idades são suscetíveis, mas os leitões novos são mais resistentes por adquirirem imunidade através da ingestão de colostro. Observou-se, no entanto, que anticorpos maternos não previnem a infecção via oral de leitões através do leite materno, concluindo-se que pode haver transmissão contínua das mães aos filhotes. Sendo assim, a busca por formas de controle para essa doença é de grande valia no que se refere aos prejuízos aos criadores. Além disso, a vacina comercial utiliza a bactéria inativada ou atenuada, o que possivelmente contribui com o aparecimento da artrite crônica nos animais vacinados e que receberam doses de reforço dessa vacina ao longo da vida.

Com os dados apresentados no experimento em que o desafio foi feito com 50xDL50 da bactéria, podemos sugerir uma capacidade da proteína recombinante de desempenhar o papel de agente imunogênico, relatando uma possível proteção do organismo frente a uma infecção pela bactéria causadora da erisipela (fig 1). Os testes realizados com a DL50 também sugerem essa proteção, como pode ser atestado pela análise da tabela. Os testes já vistos na literatura foram realizados com adjuvante de Freund (IMADA *et al*, 1999; SHIMOJI *et al*, 1999), cujo uso não é permitido para vacinas veterinárias ou humanas. O hidróxido de alumínio, testado neste trabalho e amplamente utilizado em vacinas comerciais, mostrou-se um adjuvante adequado para

ser administrado em conjunto com a proteína SpaA purificada, já que esta formulação nos permite sugerir proteção nos testes de desafio com 50xDL50 da *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

Alguns autores demonstraram que, na fase inflamatória aguda após injeção de *E. rhusiopathiae* houve aumento de macrófagos e linfócitos, inflamação generalizada, perda de peso e artrite na perna de ratos, apenas 3 dias após a infecção. (HARALD *et al.*, 1989; HASLER *et al.*, 1983). Nossos dados mostram aumento dos leucócitos totais (fig 2 e 4) e de células inflamatórias específicas (fig 3 e 5), além de ter sido observado alterações físicas como fraqueza e tontura (dados não mostrados) nesses animais, corroborando com os autores acima. Dessa forma, nos certificamos de que a bactéria utilizada realizou sua infecção, como já caracterizado na literatura. Os animais que receberam as vacinas, principalmente a vacina recombinante SpaA, apresentaram modulação desse perfil inflamatório (fig 3 e 5), possivelmente como mecanismo de controle para a infecção realizada como desafio. Assim, os animais que receberam as imunizações com SpaA de *E. rhusiopathiae* tiveram melhor resposta imune frente ao controle da infecção.

A diminuição do número de células globais nos grupos vacinados em relação ao grupo apenas infectado (fig 2 e 4) nos permite sugerir que houve uma modulação no recrutamento de leucócitos, na medula óssea, exercida pela vacina nos organismos imunizados. Isso também pode ser observado quando analisamos os dados referentes à contagem diferencial de células em que há diminuição de neutrófilos, células mononucleares e eosinófilos, tanto no primeiro experimento (fig 3A, 3B e 3C), quanto no segundo experimento (fig 5A, 5B e 5C). No entanto, mais estudos são necessários para se compreender quais mecanismos estão sendo modulados nesse recrutamento celular, como determinar integrinas que possam estar envolvidas e quimiocinas.

Embora, as três vacinas estudadas tenham levado à essa diminuição do quadro inflamatório, podemos observar que a vacina mais eficaz foi a de proteína purificada. Isso aconteceu tanto no primeiro (fig 2) quanto no segundo experimento (fig 4). A vacina de *Salmonella* estimulou uma ação semelhante a da vacina comercial, quando observado esse recrutamento celular (fig 4). Não foram encontrados na literatura trabalhos que observassem o perfil celular no modelo murino de vacina para erisipela, o que dificulta a discussão de nossos dados.

Juntos, nossos dados sugerem um efeito biológico dessas imunizações em modular a liberação dessas células da medula óssea para o sangue (fig 3 e 5), visto que a diminuição significativa dessas células sugere que fatores estimulantes como citocinas pró e inflamatórias, além de quimiocinas, selectinas e integrinas podem estar sendo moduladas pelo processo vacinal. No entanto, mais estudos precisam ser realizados a fim de caracterizar quais citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão possam estar sendo moduladas e sendo coadjuvante no controle da *E. rhusiopathiae*.

Esses dados são inéditos, visto que não foram encontrados na literatura trabalhos que demonstrassem o perfil celular no modelo de vacina contra *E. rhusiopathiae* murina, e como esses organismos se apresentam após a imunização e posteriormente desafio com a DL50 da bactéria patogênica *E. rhusiopathiae*, principalmente no que se refere ao uso da proteína SpaA como imunógeno.

Ainda, investigamos a imunogenicidade e capacidade que a imunização com a SpaA de *E. rhusiopathiae* tem de favorecer o controle da infecção por esta bactéria. A presença de anticorpos IgG anti-rSpaA no soro dos animais do primeiro experimento, dos grupos imunizados (fig 6), atestada pelo título maior desses anticorpos nessas amostras frente as dos outros dois grupos (controle e apenas infectado), indica que a vacina de proteína purificada produzida foi imunogênica, gerando uma resposta

humoral específica contra a proteína heteróloga rSpaA. O título de anticorpos da vacina de proteína purificada foi maior que o da vacina comercial. O mesmo aconteceu no segundo experimento (fig 7), em que a vacina de proteína purificada se mostrou mais eficaz em relação tanto a vacina comercial, quanto a outra vacina também por nós produzida, que é a linhagem vacinal SL3261_pMohly1_SpaA.

Conforme indicado na figura 10, podemos observar também que, apesar dos três tipos vacinais terem produzido anticorpos específicos contra a rSpaA, a vacina de proteína purificada teve melhor desempenho comparada à vacina comercial e à linhagem vacinal SL3261_pMohly1_SpaA. Isso aconteceu para a produção de IgGtotal e também para IgG1 e IgG2a. Alguns estudos, já relatados na literatura, utilizando o antígeno SpaA (MAKINO *et al.*, 1998; IMADA *et al.*, 1999; SHIMOJI *et al.*, 1999; KITAJIMA *et al.*, 2000; YOKOMIZO *et al.*, 2002; CHEUN *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2012) indicam que a produção de anticorpos específicos anti-SpaA, tanto em modelo murino, quanto em suínos, confere proteção aos animais em ensaios de desafio com o agente etiológico da erisipela suína.

Os resultados apresentados nas figuras 6 e 7 indicam que, a imunização com as vacinas propostas neste trabalho devem conferir uma proteção parcial ou total contra o agente infeccioso *E. rhusiopathiae* em modelo murino, uma vez que houve estímulo da produção de anticorpos protetores anti-rSpaA nos animais, em diferentes subclasses de anticorpos. Assim, como na análise do perfil celular neste modelo, esses dados são inéditos, visto que não foram encontrados na literatura trabalhos que demonstrassem a utilização da *Salmonella* como vetor bacteriano vivo no modelo de vacina contra *E. rhusiopathiae* utilizando a DL50 no desafio.

Podemos observar também que, a linhagem vacinal SL3261_pMohly1_SpaA favorece produção de IgG próxima à da vacina comercial, enquanto a vacina de proteína

purificada apresenta maior produção de anticorpos (fig 10) quando comparada com as outras vacinas, o que pode sugerir maior proteção frente à infecção pela *E. rhusiopathiae* nesse modelo.

Analizamos ainda a produção de duas das principais citocinas envolvidas em padrões de resposta Th1 e Th2, a fim de elucidar a tendência da resposta imunológica induzida pelas vacinas testadas nesse trabalho. Para avaliarmos o perfil Th1/Th2 da resposta, fizemos, pela técnica de ELISA, a determinação do título de IL-4 e de IL-12 séricas, cujo aumento é típico na resposta Th2 e Th1, respectivamente. Conforme mostrado na figura 11, a vacina de proteína purificada foi a mais eficaz em relação ao estímulo da liberação tanto de IL-4 quanto de IL-12. Observamos também que há, principalmente no primeiro experimento (animais heterogênicos), maior produção de IL-4, do que de IL-12 (fig 8). As vacinas parecem induzir tanto a liberação de IL-4 quanto de IL-12, mas quando comparadas ao grupo controle, mostrado nas figuras 8 e 9, percebemos que a IL-4 apresenta um aumento mais acentuado nesse modelo. Esse dado é de grande valia, visto que a resposta Th2 é mais favorável a uma vacina com caráter protetor. Em outros modelos vacinais a IL-4 e IL-12 têm sido estudadas a fim de entender como o sistema imune após a vacinação resiste à infecção por patógenos virais (ULF *et al.*, 2001). Assim, espera-se que no modelo da erisipela o mesmo possa ocorrer.

O uso do adjuvante hidróxido de alumínio contribui para a indução de inflamação local aumentando o contato do antígeno com células adicionais, que são atraídas para o local; além de formar um depósito de antígeno liberando-o mais lentamente e prolongando assim sua interação com o macrófago (RUSH e FLAMINIO, 2000). O aumento da velocidade e a duração da resposta imune, além da modulação e avides, assim como a especificidade e o isotipo para a distribuição de subclasses de anticorpos, permitem estimular a imunidade mediada por células e induzir o aumento da

resposta imunológica até em indivíduos imunologicamente imaturos ou senis (SINGH e O'HAGAN, 1999).

A fim de inferir o padrão de resposta (Th1/Th2) dos linfócitos TCD4⁺ efetores, além da determinação da concentração sérica de IL-4 e IL-12, foi feita uma análise da produção de anticorpos das subclasses (isotipos) IgG1 e IgG2a. Esse tipo de análise é feito porque as citocinas que induzem uma resposta celular (Th1), no caso a IL-12, também induzem a troca de classe das imunoglobulinas para a isoforma IgG2a e inibem a troca para IgG1. De forma oposta, as citocinas que estimulam uma resposta humoral (Th2), no caso a IL-4, levam a troca de classe para IgG1 e inibem a troca para IgG2a (MURPHY *et al*, 2010). Uma resposta do tipo Th1 é indicativa da imunidade mediada por células, enquanto uma resposta do tipo Th2 está relacionada à alta produção de anticorpos. Para o caso da erisipela suína, ambas as respostas apresentam atributos desejáveis em termos de geração de uma imunidade protetora (SHIMOJI, 2000). A resposta celular (Th1) é importante para o combate da bactéria na sua forma de infecção intracelular, enquanto a resposta humoral (Th2) é importante para neutralizar o patógeno nos sítios de entrada e desencadear o processo de produção de anticorpos por meio dos linfócitos B (SILVA *et al*, 2012).

KAREM e colaboradores (1996) realizaram um estudo em que foi feita uma análise da produção de citocinas no tecido linfoide associado ao intestino (GALT) após inoculação oral de linhagens atenuadas de *Salmonella typhimurium*. Os resultados deste trabalho mostraram que, a *Salmonella* pode induzir ambos os tipos de resposta (Th1 e Th2). Os nossos resultados em relação à linhagem vacinal SL3261_pMohly1_SpaA, corroboram com esse resultado, uma vez que a vacina de *Salmonella* parece induzir tanto a resposta Th1 quanto a Th2 (figs 7 e 9).

O desenvolvimento de uma resposta Th1 ou Th2 mais desenvolvida deve depender também de outros fatores além do veículo da vacina. Alguns outros fatores influenciam o tipo de resposta imune induzida, como: a carga antigênica, o microambiente e a natureza do antígeno (KAREM *et al.*,1996). Esses fatores, somados à estimulação de citocinas, atuam influenciando a distribuição das subclasses de IgG nesse modelo.

A análise das subclasses de IgG anti-rSpaA do soro dos animais revelou a presença de uma resposta mista Th1 e Th2, pois foi detectada a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos para o antígeno em estudo nas amostras dos grupos imunizados com as três vacinas analisadas (figs 6 e 7). Assim, esses dados demonstram que a utilização da SpaA de *Erysipelothrix rhusiopathiae* apresentou perfil com imunogenicidade de caráter protetor, podendo ser uma forte candidata à vacina para o controle da erisipela suína. Além disso, o fato de ser uma proteína recombinante diminui o risco de esses animais desenvolverem artrite, esta relacionada ao processo vacinal, em que a vacina atualmente utilizada é formada por bactéria atenuada/inativada, administrada pelo menos 2 vezes ao ano no rebanho, o que pode estar contribuindo com aparecimento dos casos de artrites nesses animais. Sendo assim, nossa proteína SpaA é uma excelente candidata ao processo vacinal que tem como objetivo o controle da erisipela suína.

6. CONCLUSÕES

- A vacina de proteína purificada se mostrou eficaz na proteção contra a bactéria, sendo que porcentagem de sobrevivência dos animais infectados com 50xDL50, após receberem a vacina, foi de 50%.
- As três vacinas testadas neste trabalho promoveram diminuição de células globais no sangue dos animais, sugerindo uma diminuição do processo inflamatório, sendo a mais efetiva em modular esse processo a proteína purificada administrada com hidróxido de alumínio.
- Houve diminuição de células inflamatórias nos animais dos grupos das três vacinas, mas a diminuição mais acentuada foi no grupo da vacina de proteína SpaA purificada, porém sem diferença estatística significativa.
- A vacina de proteína purificada SpaA foi imunogênica, gerando uma resposta humoral específica contra a proteína heteróloga rSpaA.
- Tanto a vacina de proteína purificada, quanto a linhagem vacinal SL3261_pMohly1_SpaA, mostraram um padrão de resposta misto Th1 e Th2, com uma maior tendência Th2, sugerindo um efeito protetor na erisipela.
- Os resultados obtidos com a utilização da SpaA purificada adicionada ao adjuvante foram melhores que os resultados em que a SpaA foi veiculada por um vetor bacteriano vivo – a linhagem vacinal SL3261_pMohly1_SpaA.
- A utilização da SpaA de *Erysipelothrix rhusiopathiae* para uma formulação vacinal apresentou perfil com imunogenicidade de caráter protetor, podendo ser uma forte candidata à vacina para o controle da erisipela suína, que poderá proteger os rebanhos das infecções por *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

7. BIBLIOGRAFIA

ABBAS A. K., LICHTMAN A. H., POBER J.S., Imunologia Celular e Molecular. Editora Revinter, 3ª edição 2000, 256p.

BRADFORD, W.; SHIVE, D. V. M. Erysipelas - past and present. Pfizer Animal Health, 1998.

BROOKE, C. J.; RILEY, T. V. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: Bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. Journal of Medical Microbiology, v. 48, n. 9, p. 789-799, 1999.

CARDENAS, L.; CLEMENTS, J. D. Oral immunization using live attenuated *Salmonella spp.* as carriers of foreign antigens. Clinical Microbiology Reviews, v. 5, p. 328-342, 1992.

CHEUN, H. I.; KAWAMOTO, K.; HIRAMATSU, M., et al. Protective immunity of SpaA-antigen producing *Lactococcus lactis* against *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection. Journal of Applied Microbiology, v. 96, n. 6, p. 1347-1353, 2004.

CONKLIN, R. H.; STEELE, J. H. *Erysipelothrix* infeccions. In: (Ed.). Series in zoonoses. Boca Raton: CRC Press, v.1, 1979. p.327-337.

COUTINHO, T. A.; IMADA, Y.; DE BARCELLOS, D. E. S. N., et al. Genotyping of Brazilian *Erysipelothrix spp.* Strains by amplified fragment length polymorphism. Journal of Microbiological Methods, v. 84, n. 1, p. 27-32, 2011.

DIETRICH, G.; KOLB-MAURER, A.; SPRENG, S. et al. Gram-positive and Gramnegative bacteria as carrier systems for DNA vaccines. Vaccine, v.19, p. 2506-2512, 2001.

FABÍOLA C. B. e RESENDE, JEAN PASSOLD, SILVIA I. A. C. FERREIRA, CARLOS R. ZANETTI, HERMÊNIO C. LIMA. Adjuvantes de

vacinas: possibilidades de uso em seres humanos ou animais. Revista brasileira de alergologia e imunopatologia – Vol. 27, Nº 3, 2004.

FAO, 2015: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/suinos>

FREEMAN, M. J. Effects of vaccination on the development of arthritis in swine with erysipelas: Clinical, hematological, and gross pathological observations. American Journal of Veterinary Research, v. 27, p. 597-606, 1964.

GENTSCHEV, I.; DIETRICH, G.; SPRENG, S. et al. Delivery of protein antigens and DNA by attenuated intracellular bacteria. International Journal of Medical Microbiology, v. 291, p. 577-582, 2002a.

GENTSCHEV, I.; DIETRICH, G.; GOEBEL, W. The E. coli α -hemolysin secretion system and its use in vaccine development. TRENDS in Microbiology, v. 10, p. 39-45, 2002b.

GENTSCHEV, I.; GLASER, I.; GOEBEL, W. et al. Delivery of the p67 sporozoite antigen of *Theileria parva* using recombinant *Salmonella*: secretion of the product enhances specific antibody responses in cattle. Infection and Immunity, v. 66, p. 2060-2064, 1998.

GENTSCHEV, I.; MOLLENKOPF, H.; SOKOLOVIC, Z. et al. Development of antigen delivery systems, based on the *Escherichia coli* hemolysin secretion pathway. Gene, v. 179, p. 133-140, 1996.

GOMEZ-DUARTE, O. G.; PASETTI, M. F.; SANTIAGO, A. et al. Expression, extracellular secretion, and immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2 in *Salmonella* vaccine strains. Infection and Immunity, v. 69, p. 1192-1198, 2001.

HARALD RENZ, UWE GENTZ, ANETTE SCHMIDT, THOMAS DAPPER, MARIANNE NAIN, AND DIETHARD GEMSA. Activation of Macrophages in an

Experimental Rat Model of Arthritis Induced by *Erysipelothrix rhusiopathiae* Infection. INFECTION AND IMMUNITY, Oct. 1989, p. 3172-3180.

HASLER, F., H. G. BLUESTEIN, N. J. ZVAIFLER, and EPSTEIN L. B., 1983. Analysis of the defects responsible for the impaired regulation of EBV-induced B cell proliferation by rheumatoid arthritis lymphocytes.II. Role of monocytes and the increased sensitivity of rheumatoid arthritis lymphocytes to prostaglandin E. J. Immunol. 131:768-772.

HESS, J.; GENTSCHEV, I.; MIKO, D. *et al.* Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, v. 93, p. 1458- 1463, 1996.

HESS, J.; GRODE, L.; HELLWIG, J. *et al.* Protection against murine tuberculosis by an attenuated recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain that secretes the 30-kDa antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. FEMS Immunology and Medical Microbiology, v. 27, p. 283-289, 2000.

IMADA Y., GOJI N., ISHIKAWA H., KISHIMA M., SEKIZAKI T.: Truncated surface protective antigen (SpaA) of *Erysipelothrix rhusiopathiae* serotype 1a elicits protection against challenge with serotypes 1a and 2b in pigs. Infect Immun 1999, 67:4376-4382.

JENSEN, E. R.; SHEN, H.; WETTSTEIN, F. O. *et al.* Recombinant *Listeriamonocytogenes* as a live vaccine vehicle and a probe for studying cell-mediatedimmunity. Immunology Reviews, v. 158, p. 147-157, 1997.

KAREM, K. L.; KANANGAT, S.; ROUSE, B. T. Cytokine expression in the gut associated lymphoid tissue after oral administration of attenuated *Salmonella* vaccine strains. *Vaccine*, v. 14, n. 16. p. 1495-1502, 1996.

KITAJIMA; OISHI, E.; AMIMOTO, K., *et al.* Quantitative diversity of 67 kDa protective antigen among serovar 2 strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its

implication in protective immune response. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v. 62, n. 10, p.1073-1077, 2000.

KUCSERA, G. R. Proposal for standardization of the designations used for serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* (migula) buchanan. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 23, n. 2, p. 184-188, 1973.

LACHMANN, P. G.; DEICHER, H. Solubilization and characterization of surface antigenic components of *Erysipelothrix rhusiopathiae* t28. *Infection and Immunity*, v. 52, n. 3, p. 818-822, 1986.

LILJEQVIST, S.; STAHL, S. Production of subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *Journal of Biotechnology*, v. 73, p. 1- 33, 1999.

MAKINO, S.-I.; YAMAMOTO, K.; MURAKAMI, S., et al. Properties of repeat domain found in a novel protective antigen, SpaA, of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Microbial Pathogenesis*, v. 25, n. 2, p. 101-109, 1998.

MASTROENI P., CHABALGOITY J. A., DUNSTAN S. J., MASKELL D. J., Dougan G. *Salmonella*: immune responses and vaccines. *Vet J* 2000;161:132–64.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. *Imunobiologia de Janeway*. 7ed. Artmed, 2010.

NAKAJIMA, Erika; Investigação de proteínas candidatas vacinais contra leptospirose. Apresentação de antígenos na forma de proteínas recombinantes purificadas ou como vacinas vivas em *Salmonellas* atenuadas. 2010.

NORIEGA, F.; FORMAL, S. B.; KOTLOFF, K. L. et al. Vaccines against *Shigella* infections Part II: engineered attenuated mutants of *Shigella* as oral vaccines. In: *New Generation Vaccines*, 2.ed. (Levine , M. M. et al., eds), p. 853. Marcel Dekker, New York, 1997.

OGAWA, Y.; OOKA, T.; SHI, F., et al. The genome of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, the causative agent of swine erysipelas, reveals new insights into the evolution of firmicutes and the organism's intracellular adaptations. *Journal of Bacteriology*, v. 193, n. 12, p. 2959-2971, 2011.

REBOLI, A. C.; FARRAR, W. E. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: An occupational pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 2, n. 4, p. 354-359, 1989.

RUSH B. R., FLAMINIO M. J., Immunomodulation in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2000;16: 183-97.

RYAN, E. T.; BUTTERTON, J. R.; SMITH, R.N. et al. Protective immunity against *Clostridium difficile* toxin A induced by oral immunization with a live, attenuated *Vibrio cholerae* vector strain. *Infection and Immunity*, v. 65, p. 2941-2949, 1997.

SCHMIEL, D. H.; MILLER, V. L. Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes and Infection*, v. 1, n. 13, p. 1103-1112, 1999.

SHATA, M. T.; STEVCEVA, L.; AGWALE, S. et al. Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors. *Molecular Medicine Today*, v. 6, p. 66-71, 2000.

SHIMOJI, Y.; OGAWA, Y.; OSAKI, M., et al. Adhesive surface proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae* bind to polystyrene, fibronectin, and type I and IV collagens. *Journal of Bacteriology*, v. 185, n. 9, p. 2739-2748, 2003.

SHIMOJI, Y. Pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: Virulence factors and protective immunity. *Microbes and Infection*, v. 2, n. 8, p. 965-972, 2000.

SHIMOJI, Y.; YOKOMIZO, Y.; SEKIZAKI, T., et al. Presence of a capsule in *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its relationship to virulence for mice. *Infection and Immunity*, v. 62, n. 7, p. 2806-2810, 1994.

SHIMOJI, Y.; MORI, Y.; FISCHETTI, V. A. Immunological characterization of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: Identification of the region responsible for protective immunity. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 4, p. 1646-1651, 1999.

SILVA, A. J., Auto-induction Expression, and Purification of rSpaA Swine Erysipelas Antigen, 2012.

SILVA, A.J., GIORDANO, R. C. ; IEMMA, M. R. C. ; NOVO, M. T. M.; ZANGIROLAMI, T. C. ; GIORDANO, R. L. C. ; HORTA, A. C. L. ; SARGO, C. R., Cloning, Auto-induction Expression, and Purification of rSpaA Swine Erysipelas Antigen. *Current Microbiology*, v. 1, p. 1, 2012.

SINGH M., O'HAGAN D., Advances in vaccine adjuvants. *Nat Biotechnol.* 1999;17:1075-81.

SOLER, E.; HOUDEBINE, L. M. Preparation of recombinant vaccines. *Biotechnology Annual Review*, v. 13, p. 65-94, 2007.

SPRENG, S.; DIETRICH, G.; GOEBEL, W. *et al.* The *Escherichia coli* haemolysin secretion apparatus: a potential universal antigen delivery system in gram-negative bacterial vaccine carriers. *Molecular Microbiology*, v. 31, p. 1596-1598, 1999.

SPRENG, S.; GENTSCHEV, I.; GOEBEL, W. *et al.* *Salmonella* vaccines secreting measles virus epitopes induce protective immune responses against measles virus encephalitis. *Microbes and Infection*, v. 2, p. 1687-1692, 2000.

STACKEBRANDT, E.; GENUS, I. *Erysipelothrix*. In: P. D. Vos, G. M. Garrity, et al. (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York: Springer-Verlag, v.3, 2009. p.1299-1306.

STRAW, B.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L., *et al.* *Diseases of swine*. Iowa: Iowa State University Press. 1999.

SWAN, R.A., LINDSEY, M.J. Treatment and control by vaccination of erysipelas in farmed emus (*Dromaius novohollandiae*). Australian Veterinary Journal, v. 76, p. 325-327, 1998.

TOMASZUK-KAZBERUK, A.; KAMIŃSKA M.; B., S., *et al.* Infective endocarditis caused by *Erysipelothrix rhusiopathiae* involving three native valves. Kardiologia Polska, v. 69, n. 8, p. 827–829, 2011.

ULF DITTMER, KARIN E. PETERSON, RON MESSER, INGUNN M. STROMNES, BRENT RACE, AND KIM J. HASENKRUG. Role of Interleukin-4 (IL-4), IL-12, and Gamma Interferon in Primary and Vaccine-Primed Immune Responses to Friend Retrovirus Infection. JOURNAL OF VIROLOGY, 2001, p. 654–660 (DOI: 10.1128/JVI.75.2.654–660.2001).

VARELLA, P. P. V., FORTE V. C. W., Citocinas: revisão. *Rev. bras. alerg. imunopatol.* 2001; 24(4):146-154p.

WANG, Q.; CHANG, B. J.; RILEY, T. V. *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Veterinary Microbiology, v. 140, n. 3-4, p. 405-417, 2010.

WOOD, R. L. Erysipelas. In: A. D. Leman (Ed.). Disease of swine. Iowa: Iowa State University Press, 1992. p.475-486.

WOOD, R. L.; HARRINGTON JR, R. Serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from swine and from soil and manure of swines pens in the united states. American Journal of Veterinary Research, v. 39, n., p. 1833-1840, 1978.

YOKOMIZO, Y.; WATANABE, F.; IMADA, Y. *et al.* Mucosal immunoadjuvant activity of the low toxic recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin produced by bacillus brevis for the bacterial subunit or component vaccine in pigs and cattle. Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 87, n. 3-4, p. 291-300, 2002.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética no Uso de Animais
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679
Fax: (016) 3351.8025
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
ceua@ufscar.br - www.propq.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais
n° 2-064/2013

Protocolo n°. 064/13

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa intitulado *Efeito da imunização com vacina recombinante do antígeno de superfície SpaA de E. rhusiopathiae em modelo murinho* submetido pela Pesquisadora **Luciana Camillo**.

São Carlos, 17 de março de 2014

Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais