



Universidade Federal da Bahia
Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos

**PROTEÍNAS RECOMBINANTES PLD E CP40 ASSOCIADAS OU
FUSIONADAS COMO IMUNÓGENOS NA IMUNOPROFILAXIA DA
LINFADENITE CASEOSA EM OVINOS**

Mauricio Alcântara Kalil

Salvador – Bahia

2022

Mauricio Alcântara Kalil

**PROTEÍNAS RECOMBINANTES PLD E CP40 ASSOCIADAS OU
FUSIONADAS COMO IMUNÓGENOS NA IMUNOPROFILAXIA DA
LINFADENITE CASEOSA EM OVINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos, da Universidade Federal da Bahia, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal nos Trópicos.

Área de concentração: Saúde Animal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner Dias Portela

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Meyer

Salvador – Bahia

27 de outubro de 2022

Kalil, Mauricio Alcântara.

Proteínas recombinantes PLD e CP40 associadas ou fusionadas como imunógenos na imun_o profilaxia da linfadenite caseosa em ovinos / Mauricio Alcântara Kalil. - 2022.

77 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner Dias Portela.

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Meyer.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador, 2022.

1. Medicina veterinária. 2. Patologia veterinária. 3. Ovinos - Doenças. 4. Linfadenite caseosa - Vacina. 5. Corynebacterium. I. Portela, Ricardo Wagner Dias. II. Universidade Federal da Bahia. Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

CDD - 636.3089
CDU - 636.3:591.2


**PROTEÍNAS RECOMBINANTES PLD E CP40 ASSOCIADAS OU
FUSIONADAS COMO IMUNÓGENOS NA IMUNOPROFILAXIA DA
LINFADENITE CASEOSA EM OVINOS**

MAURICIO ALCÂNTARA KALIL

**Tese defendida e aprovada para obtenção do grau de Doutor em Ciência
Animal nos Trópicos**

Salvador, 27 de outubro de 2022

Comissão examinadora:



Dr. Ricardo Wagner Dias Portela
(UFBA)
(Presidente)

Dra. Melissa Hanzen Pinna Valentim
(UFBA)

Dra. Lina Costa
(IPPortalegre)

Dra. Vasco Ariston Carvalho Azevedo
(UFMG)

Dra. Debora Andréa Evangelista Façanha
(UNILAB)


Luis Fernando Pita Gondim
Coordenador PPGCAT
EMEVZ / UFBA

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MAURICIO ALCÂNTARA KALIL- Nascido em 25 de março de 1975 na cidade de Salvador, estado da Bahia, Brasil. Graduado em Medicina Veterinária pela Universidade Federal da Bahia no ano de 2000, tendo se especializado em Produção de Pequenos Ruminantes no ano de 2006, e obtido título de Mestre em Ciência Animal nos Trópicos em 2019 pela mesma instituição. Lecionou na escola de formação agrotécnica Escola Família Agrícola do Sertão, no município de Monte Santo - BA, entre os anos de 2006 e 2017, e possui atividades em extensão rural no semiárido baiano.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pois “todas as coisas são Dele, por Ele e para Ele.” (Rom. 11.36)

Agradeço à minha esposa Cleide pelo apoio nesses anos de temores e incertezas, durante meu doutorado.

Aos meus pais e meus irmãos, por trilhar comigo esse percurso.

Ao Prof. Ricardo Portela, por permanecer confiando em mim nessa jornada acadêmica, e se tornando mais que um orientador, e sim um amigo.

Ao colega Marcos Mendonça e seus alunos Gabriel Calazans, Gabriel Lima, Amon Martins e Luiz Henrique da Universidade Salvador (UNIFACS), pelo apoio nas coletas iniciais de material para a pesquisa.

A todos colegas do Grupo de Pesquisa de Biotecnologia Aplicada à Saúde Animal pela ajuda nesse processo, e em especial a Thiago Barral e Gabriela Piedade, os quais, frente a meus problemas de saúde, se fizeram presentes em campo e na bancada.

Ao amigo Joston Olímpio Cardoso do Nascimento, pelo apoio na aquisição e logística inicial com animais no início do projeto.

Ao Prof. Ricardo Guerra e ao Eng. Agrônomo Edgar Leal, pelo apoio no uso das instalações da Fazenda Experimental da UFBA, em São Gonçalo dos Campos.

Ao Prof. Dr. Raghuvir Arni e ao Dr. Ricardo Mariutti, pelo auxílio na expressão das proteínas recombinantes.

À Profa. Alessandra Estrela Lima e ao Dr. Carlos Humberto da Costa Vieira Filho, pela colaboração nas análises histopatológicas, tão importantes nesse trabalho.

Ao Prof. Roberto Meyer, pela oportunidade de trabalhar no LABIMUNO.

À Sra. Maria Zilda Lima dos Santos, supervisora administrativa do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do ICS/ UFBA, pela imensa disposição e colaboração durante o experimento.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos pela oportunidade de realização do doutorado, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

RESUMO

KALIL, M.A. **Proteínas recombinantes PLD e CP40 associadas ou fusionadas como imunógenos na imunoprofilaxia da linfadenite caseosa em ovinos.** Salvador, 2022, 77 pp., Tese (Doutor em Ciência Animal nos Trópicos), Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal da Bahia.

A linfadenite caseosa é uma doença infectocontagiosa causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, sendo associada a significativos impactos econômicos na criação de caprinos e ovinos. O tratamento da doença não é eficiente e não previne recidivas, e não há ainda uma profilaxia vacinal verdadeiramente eficiente para ambos caprinos e ovinos. Desta forma, o presente trabalho aborda duas propostas de formulações vacinais contendo as proteínas recombinantes PLD e CP40. As duas proteínas foram avaliadas associadas ou em forma fusionada (adicionada de maltose binding protein - MBP) com o uso de ferramentas de bioinformática, sendo posteriormente expressas. Vinte e sete ovinos foram divididos em 3 grupos, um grupo controle (G1), outro com as proteínas fusionadas e adicionado o MBP (G2) e outro com as proteínas rPLD e rCP40 separadas. A segunda dose foi administrada 21 dias depois e o desafio com uma cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis* foi realizado 15 dias após este. Ao longo de 12 semanas, os animais foram avaliados clinicamente, sendo retirados os granulomas superficiais surgidos para análise microbiológica. Também foram realizados o acompanhamento da produção de anticorpos e análise de produção específica de IFN- γ e IL-4. Ao final do período experimental, os animais foram eutanasiados e necropsiados para avaliação de lesões internas. O grupo imunizado com as proteínas fusionadas, quando comparado ao grupo controle, teve uma redução no número de lesões de 71,42%, e o de proteínas associadas 90,4%, sendo que esse último grupo apresentou maiores produções de anticorpos e de citocinas. Dos animais imunizados com a associação de proteínas recombinantes, 77,77% não desenvolveram lesões, sendo esse valor de 33,33% para o grupo proteína de fusão; todos os ovinos do grupo controle desenvolveram lesões. Conclui-se que as respostas obtidas pela proposta vacinal com proteínas associadas a torna viável na imunoprofilaxia da linfadenite caseosa em pequenos ruminantes por induzir imunoproteção e produção de citocinas e anticorpos específicos.

Palavras-chave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Vacina, Proteína de Fusão, Pequeno Ruminante.

ABSTRACT

KALIL, M.A. **Recombinant PLD and CP40 proteins associated or fused as immunogens in the immunoprophylaxis of caseous lymphadenitis in sheep.** Salvador, 2022, 77 pp., Tese (in Animal Science), Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal da Bahia.

Caseous lymphadenitis is an infectious disease caused by the bacterium *Corynebacterium pseudotuberculosis*, being associated with significant economic impacts on goat and sheep farming. The treatment of the disease is not efficient and does not prevent relapses, and there is still no truly efficient immunoprophylaxis for both goats and sheep. Thus, the present work addresses two proposals for vaccine formulations containing the recombinant proteins PLD and CP40. The two proteins were evaluated as an association or in a fused form (added with maltose binding protein - MBP) using bioinformatics tools, and subsequently expressed. Twenty-seven sheep were divided into 3 groups, which were inoculated twice with separate rPLD and rCP40 proteins (G3), the same proteins fused and added with MBP (G2), and a control group (G1). A challenge with a virulent strain of *C. pseudotuberculosis* was performed 15 days after the second dose. Over 12 weeks, the animals were clinically evaluated, and the surface granulomas that appeared were removed for microbiological analysis. Monitoring of antibody production and analysis of specific production of IFN- γ and IL-4 were also performed. At the end of the experimental period, the animals were euthanized and necropsied to evaluate internal lesions. The group immunized with the fused proteins, when compared to the control group, had a reduction in the number of lesions of 71.42%, and the one immunized with the associated proteins 90.4%, with the latter group showing a higher production of antibodies and cytokines. 77.7% of the animals immunized with the association of recombinant proteins developed lesions, while this value was 33.3% for the fusion protein group; all sheep in the control group developed lesions. It can be concluded that the responses obtained by the vaccine proposal with associated proteins is viable in the immunoprophylaxis of caseous lymphadenitis in small ruminants, since it was able to induce immunoprotection and production of specific cytokines.

Key words: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Vaccine, Fusion Protein, Small Ruminants.

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Estrutura 3D da proteína de fusão MBP:PLD:CP40.....	34
Figura 2	Ancoragem da proteína MBP:PLD:CP40 com o receptor TLR2.....	36
Figura 3	SDS-PAGE 15% evidenciando a purificação por cromatografia de afinidade da proteína de fusão MBP:PLD:CP40.....	37
Figura 4	<i>Western blot</i> utilizando anticorpo anti-poli-histidina.....	38
Figura 5	Plotagem gráfica da análise de DLS da proteína de fusão.....	38
Figura 6	Espectro CD-UV característico da proteína de fusão MBP:PLD:CP40, a 25°C em Tris 20 Mm e NaCl 100 mM (pH 7,4).	39
Figura 7	Média de peso das carcaças dos animais dos grupos experimentais.....	40
Figura 8	Média de peso das carcaças dos animais dos grupos experimentais.....	43
Figura 9	Análise de secções histológicas de lesões granulomatosas de pulmão de animais do grupo controle.....	44
Figura 10	Análises de secções histológicas de pulmão de animais do grupo proteína de fusão.	45
Figura 11	Sorologia dos grupos em relação ao teste anti-rPLD, relação ao teste anti-rCP40 e relação ao teste anti-rPLD juntamente com anti-rCP40.....	46
Figura 12	Produção de citocinas IFN- γ e IL-4 dos grupos experimentais e média dos controles negativos de produção.	48

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Antígenos e eficácia de ensaios vacinais utilizando engenharia genética e desenho molecular contra a linfadenite caseosa em ovinos.....	23
Tabela 2	Tampões utilizados para a purificação por cromatografia de afinidade por íons imóveis em coluna de purificação contendo resina Ni-Sepharose	28
Tabela 3	Sequência de aminoácidos da proteína de fusão MBP:PLD:CP40.....	33
Tabela 4	Sequências com maior probabilidade de ligação com MHC I de bovino (<i>Bos taurus</i>)	35
Tabela 5	Porcentagem de frações de estrutura secundária da MBP-PLD-CP40 quimérica de <i>C. pseudotuberculosis</i> , obtidas através de experimentos UV-CD.	39
Tabela 6	Número de lesões granulomatosas em linfonodos superficiais nos animais de cada grupo experimental.....	41
Tabela 7	Comparação do número de lesões granulomatosas nos animais dos grupos experimentais, <i>ante-mortem</i> e na necropsia.....	42

LISTA DE SIGLAS

BALT	<i>Bronchus-associated lymphoid tissue</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
IFN- γ	Interferon gama
IL-4	Interleucina 4
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
LB	Luria Bertani
MBP	<i>Maltose Binding Protein</i>
MHC I	Complexo de histocompatibilidade classe I
OD	Densidade ótica
PBS-T	Solução fosfato salina tamponada e Tween 20
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PLD	Fosfolipase D
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
TLR2	Receptor Toll-Like 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. HIPÓTESE	15
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
4.1 Relevância econômica da linfadenite caseosa na produção de pequenos ruminantes.	16
4.2 <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	17
4.3 A linfadenite caseosa	19
4.4 A profilaxia vacinal contra a linfadenite caseosa como alternativa de erradicação.	21
5. MATERIAIS E MÉTODOS	24
5.1 Fase de desenvolvimento <i>in silico</i>	24
5.1.1 Construção da sequência das proteínas de fusão MBP:PLD:CP4 e individualizadas.....	24
5.1.2 Observação dos modelos tridimensionais e estrutura proteica terciária ..	24
5.1.3 Análise de ancoragem em MHC I e em receptor Toll-Like 2 (TLR2)	24
5.2 Produção e análise da proteína	25
5.2.1 Clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes.....	25
5.2.2 <i>Western blot</i> e produção em escala	26
5.2.3 Purificação da proteína alvo	27
5.2.4 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	28
5.2.5. Espectroscopia de dicroísmo circular.....	28
5.3 Animais dos grupos experimentais	29
5.4 Imunização e desafio	29
5.5 Avaliação clínica e coleta de material	30
5.6 Necropsia dos animais	30
5.7 Análises laboratoriais	31
5.7.1 ELISA para verificação da resposta imune humoral dos animais	31
5.7.2 Ensaio de produção de IFN-gama e IL-4 específico	31

5.7.3 Análises microbiológica e molecular do material caseoso coletado <i>ante-mortem</i> e na necropsia.	31
5.8 Análises estatísticas	32
6. RESULTADOS	33
6.1 Análise imunobioinformática da proteína de fusão PLD:CP40:MBP...	33
6.1.1 Sequência de aminoácidos da proteína de fusão	33
6.1.2 Estrutura 3D da proteína de fusão PLD:CP40:MBP	34
6.1.3 Ancoragem da proteína de fusão em MHC I.....	35
6.1.4 Ancoragem da proteína de fusão MBP:PLDCP40 com o receptor TLR2	35
6.1.5 Clonagem, expressão e purificação	37
6.2 Avaliação clínica dos animais	40
6.3 Necropsia dos animais	41
6.4 Avaliação histopatológica do material coletado de necropsia	43
6.5 Resposta Imune Humoral	45
6.6 Avaliação da produção de IFN-γ e IL-4 específicos	47
7.0 DISCUSSÃO	49
8.0 CONCLUSÃO	55
9.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
10.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	73
ARTIGOS PUBLICADOS NO PERÍODO DO DOUTORADO	73
ARTIGOS SUBMETIDOS	75
APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	77

1. Introdução

O Brasil possui um rebanho ovino de 20,5 milhões de animais, e a maior parte deles se encontram nos estados do Nordeste, sendo que a Bahia se destaca, com um rebanho de 3,5 milhões de animais (IBGE, 2020). Esta realidade se justifica pela ovinocultura ser uma atividade de grande importância no semiárido brasileiro, tanto do ponto de vista social quanto econômico, além desta região apresentar uma vocação natural para este modelo de produção animal (VOLTOLINI et al, 2011).

As enfermidades infecciosas são uma fonte de grandes perdas econômicas na ovinocultura, e dentre elas uma que apresenta grande importância é a linfadenite caseosa. Chiebao (2017) a descreve como sendo uma inflamação dos linfonodos, os quais se apresentam aumentados de volume, contendo abscessos com conteúdo de pus amarelo-esverdeado e de consistência viscosa. Seu agente etiológico é o *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o qual, além de ovinos, pode infectar outras espécies, inclusive o homem em raros casos. Sua apresentação se faz de forma superficial ou visceral, e como o agente é eliminado com o exsudato purulento das lesões, pode infectar outros animais através de ferimentos na pele, pela ingestão de água e alimentos contaminados, ou por via aerógena (CEBRA e CEBRA, 2000; VESCHI, et al, 2015). Os prejuízos causados ao produtor são representados pela desvalorização da pele, da carcaça, e dos animais para revenda.

Dorella et al (2006) descrevem o *C. pseudotuberculosis* como sendo uma espécie inserida no grupo supragenérico dos Actinomicetos, que também inclui os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*. Este grupo de microrganismos, também chamado CMNR, é caracterizado por uma parede celular composta principalmente de peptidoglicanos, arabinogalactanos e ácidos micólicos, bem como elevado teor de guanina-citosina do genoma. O *C. pseudotuberculosis* produz a toxina fosfolipase D (PLD), uma esfingomielinase que o protege da fagocitose e também favorece sua disseminação no hospedeiro (BAIRD e FONTAINE, 2007). Além disto, esta toxina proporciona também o aumento da permeabilidade vascular local (BATLEY, 1986).

A inocuidade da antibioticoterapia sistêmica ocorre pela inacessibilidade dos fármacos ao agente etiológico, como consequência da presença da cápsula nodular; porém, quando testada *in vitro*, a bactéria se mostra sensível a diversos antibióticos (SÁ et al, 2013). Por este motivo a terapêutica preconizada é a remoção cirúrgica do conteúdo caseoso do granuloma superficial, com posterior cauterização química com tintura de iodo a 10% (VESCHI, 2011).

Mas considerando a citotoxicidade do iodo relatada por Ballin e Pratt (2002), foram realizados outros estudos utilizando agentes antimicrobianos diferentes, os quais obtiveram resultados promissores, como o trabalho de Kalil et al (2019) utilizando uma pomada a base de própolis verde, e o trabalho de Santos et al (2019) utilizando uma pomada contendo nanopartículas de prata.

A profilaxia vacinal tem sido testada desde 1971, quando uma vacina inativada foi testada em camundongos, tendo Cameron e Engelbrecht (1971) obtido proteção parcial. Não diferentemente, outros trabalhos testaram a imunização com microrganismos vivos atenuados (RIBEIRO et al, 1991; MEYER et al, 2002 e MOURA-COSTA et al, 2008), mas atualmente a biotecnologia baseada na modelagem genética de subunidades bacterianas tem sido mais comumente explorada, apresentando resultados promissores (RIBEIRO et al, 2014, DROPPA-ALMEIDA et al, 2016).

A fosfolipase D recombinante tem sido usada com frequência em trabalhos vacinais, obtendo bons resultados (SELIM et al, 2010 e MOUSSA et al, 2016). Não diferentemente, Silva et al (2014) também obtiveram resultados promissores utilizando a proteína recombinante denominada rCP40. Barral et al, 2022a) inovou, testando a proteína de fusão PLD:CP40 associada à MBP (*Maltose Binding Protein*) como imunoprotetor em camundongos, também com resultados promissores. Objetivando verificar o potencial imunoprotetor desta proteína de fusão em pequenos ruminantes, o presente trabalho propôs imunizar ovinos com esta proteína de fusão, e em forma comparativa também com as proteínas CP40 e PLD associadas, observando sua capacidade de induzir a produção de anticorpos e de citocinas, e a consequente diminuição de lesões e de animais enfermos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito imunoproliférico contra a linfadenite caseosa de formulações vacinais utilizando as proteínas rPLD e rCP40 associadas ou fusionadas, em ovinos.

2.2 Objetivos específicos

- Construir o gene sintético da proteína de fusão MBP:PLD:CP40;
- Montar modelo estrutural 3D e avaliar a imunogenicidade e as propriedades físico-químicas *in silico* da proteína de fusão utilizando *softwares* online;
- Sintetizar e clonar o gene da proteína de fusão MBP:PLD:CP40;
- Expressar e purificar a proteína de fusão em sistema heterólogo;
- Verificar a produção específica de anticorpos induzida pela vacinação;
- Verificar, através de produção específica de IFN- γ e IL4, a ativação da imunidade celular;
- Verificar, sorologicamente, reações cruzadas entre os antígenos testados;
- Analisar a redução de sinais clínicos da linfadenite caseosa em ovinos e a diminuição de animais doentes induzida pela vacinação com as formulações.
- Analisar, através de necropsia, possíveis efeitos da vacinação nos animais

3. Hipótese

A associação ou a fusão das proteínas PLD e CP40 de *C. pseudotuberculosis* confere proteção contra um desafio com uma cepa patogênica da bactéria, e induz a ativação das imunidades humoral e celular.

4. Revisão bibliográfica

4.1 Relevância econômica da linfadenite caseosa na produção de pequenos ruminantes

A ovinocultura produz 16 milhões de toneladas de carne mundialmente, com perspectiva de crescimento em torno de 8% até o ano de 2027, quando se estima atingir o consumo *per capita* de 35,4 Kg de carne ovina por ano (OECD/FAO, 2018). Contudo, de acordo com Lucena et al (2018), o consumo *per capita* brasileiro atualmente não atinge 500g/ano, isso porque o sistema de produção vigente, em sua grande maioria, ainda necessita de maior tecnificação, assim como a comercialização apresenta-se muito informal.

Estudos realizados em estados nordestinos brasileiros, como os de Alencar et al (2010) em Pernambuco, Pinheiro Junior et al (2010) em Alagoas, Teixeira et al (2015) no Maranhão, Lins et al (2018) na Paraíba, e também no norte de Minas Gerais como o de Almeida et al (2010), confirmam que a baixa tecnificação decorrente de condições econômicas adversas amplia os problemas sanitários, gerando assim uma baixa produtividade. Esta confirmação se faz inclusive em rebanhos europeus, os quais diminuiram cerca de 16% devido à redução de incentivos financeiros (ROSSI, 2017). Apesar das dificuldades apresentadas, a região nordeste é a que possui o maior rebanho de caprinos e ovinos, com 92,8% e 65,6% do rebanho nacional, respectivamente, tendo havido um crescimento de 15,9% no de ovinos nos últimos 10 anos (MAGALHÃES et al, 2018).

Dentre os problemas sanitários que afetam produção de pequenos ruminantes, está a linfadenite caseosa, a qual, nos trabalhos nordestinos e no mineiro supracitados, se apresenta com uma incidência média de 82,53% das propriedades avaliadas. Considerando que nestes trabalhos a análise foi unicamente clínica, o valor se mostra próximo do demonstrado em uma avaliação sorológica feita em caprinos de nove estados nordestinos por Farias et al (2018), no qual a prevalência foi de 88,5%, assim como no trabalho de Alves et al (2019) em quatro estados da mesma região, com semelhante metodologia sorológica em caprinos e ovinos, o qual encontrou 94,17% de prevalência.

Vários fatores justificam os índices altos apresentados, sendo um deles o nível baixo de tecnificação, o qual é diretamente associado ao baixo nível de escolaridade dos produtores da região, como mostra o estudo de Guilherme et al (2017) realizado no estado da Paraíba, onde 83,9% dos produtores tinham apenas escolaridade básica. Um maior nível técnico representaria uma melhoria do manejo sanitário e, quando associado às condições climáticas da região, poderiam configurar uma drástica redução nesses índices, como constata Kumar et al (2012),

onde o aumento da tecnificação de algumas propriedades de uma região árida indiana levou a uma redução da prevalência da doença.

O prejuízo acarretado pela linfadenite caseosa no mercado de carne ovina é significativo, sendo dimensionado por Patton et al (2003) entre de US\$ 12 e 15 milhões em abatedouros australianos. Geralmente, o índice de condenação de carcaças de ovinos adultos pela doença em abatedouros varia de 3 a 5% (RADOSTITS et al, 2007). Além da grande perda com o corte ou descarte total das carcaças, ainda há a emaciação dos animais, apresentada em uma forma crônica conhecida no Reino Unido como “síndrome da ovelha magra” (BAIRD, 2007), a qual pode interferir decisivamente na capacidade dos animais se nutrirem adequadamente, e por consequência terem ganho de peso. Se for considerado o custo anual de aproximadamente US\$ 92,00 por animal com tratamento cirúrgico e pós cirúrgico convencional, em um rebanho cerca de 100 animais (FACCIOLI-MARTINS et al, 2014), e considerando também os dados oficiais do plantel brasileiro em 20,5 milhões de ovinos, este custo anual no Brasil se apresentaria em aproximadamente US\$ 19 milhões anuais, o que somado às outras perdas já relatadas, reforça a relevância econômica desta patologia na ovinocultura brasileira e mundial.

4.2 *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Quinn et al (2003) classificam morfologicamente o gênero *Corynebacterium* como se apresentando em formas cocóides, clavadas ou bacilos, e em esfregaço se mostrando em paliçadas angulares semelhantes a letras chinesas. Gram-positiva, está inserida em um grupo supragenérico dos Actinomicetos que também inclui os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*. Este grupo de microrganismos, chamado CMNR, possui parede celular composta principalmente de peptidoglicanos, arabinogalactanos e ácidos micólicos, bem como elevado teor de guanina-citosina do genoma (DORELLA et al, 2006).

Corynebacterium pseudotuberculosis é o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos e ovinos, e esporadicamente pode acometer outras espécies domésticas. Sood, et al (2012) relatam um caso confirmado de uma bezerra na Índia que apresentou linfonodos mesentéricos com presença de material caseoso, onde se supunha que a infecção tinha sido ocasionada pela ingestão involuntária de moscas domésticas. Como no Brasil, a criação de espécies diferentes no mesmo ambiente é comum na Índia. Em Portugal, casos foram confirmados e descritos em suínos da raça preto alentejano em duas fazendas, sem relação comercial entre elas. Os animais acometidos eram leitões de até 10 meses, sendo constatada a doença em até 10% do plantel. A maior parte dos granulomas supurados se localizavam nos

linfonodos mandibular e retrofaríngeo, e os animais que vinham a óbito apresentavam poliartrite (OLIVEIRA et al, 2014).

Diversos trabalhos descrevem o acometimento de espécies menos comuns, mas da mesma subordem dos ovinos e caprinos, como por exemplo camelídeos (RADWAN et al, 1989; TEJEDOR et al, 2004; TEJEDOR-JUNCO et al, 2008; TARAZI e Al-ANI, 2015 e WERNERY e KINNE, 2016), cervídeos (MATOS et al, 2015 e MORALLES et al, 2017), ou ainda em cabras montanhesas (DOMENIS et al, 2018). Menos raro que os casos relatados em suínos, no que tange a monogástricos, são os casos descritos em equinos (DOHERR et al, 1998; FOLEY, et al, 2003 e PRATT et al, 2005). Contudo, em equinos, a infecção normalmente ocorre pelo biovar *equi* da bactéria, cuja sintomatologia induzida é a linfangite ulcerativa. e em bovinos se apresenta na forma de abscessos superficiais (RADOSTITS et al, 2007).

Também é possível diferenciar o biovar *equi* do biovar *ovis*, que geralmente acomete ovinos e caprinos, através de provas bioquímicas, onde o primeiro reduz nitrato em nitrito, e o segundo não (SONGER et al, 1988). As demais provas bioquímicas diferenciais do *C. pseudotuberculosis* são catalase e urease positivo, fermenta carboidratos sem a produção de gás (maltose, manose, glicose) e não fermenta a lactose, não tem atividade proteolítica, e é oxidase negativo (MOURA-COSTA, 2002).

A primeira vez que foi isolada foi exatamente de um caso de linfangite em uma vaca, no ano de 1888, pelo bacteriologista francês Edward Nocard. Anos depois, outro bacteriologista, o búlgaro Hugo von Preïsz, isolou um organismo análogo de um caso de linfadenite caseosa. Este microrganismo foi inicialmente denominado *Bacillus pseudotuberculosis*, nome durou até o final do Século XIX pela semelhança clínica das lesões causadas por *Mycobacterium pseudotuberculosis*. Foi posteriormente classificado no gênero *Corynebacterium* e renomeado como *Corynebacterium ovis*. Porém, por ter sido isolado de outras espécies, em 1948 finalmente foi denominado como *C. pseudotuberculosis* (BAIRD e FONTAINE, 2007).

Em humanos, os casos relatados são esporádicos, como os 10 casos que Peel et al (1997) revisaram, sendo que a maioria deles era de pessoas que trabalhavam na ovinocultura. Liu et al (2005) relatam um caso de infecção ocular em um homem de 63 anos que tinha convivência com animais domésticos, mas sem detalhar quais espécies. Em 2015, foi igualmente relatado um caso de uma estudante de medicina veterinária que foi diagnosticada com pneumonia causada por *C. pseudotuberculosis*, reforçando a possibilidade de contaminação também por via aerógena (HEGGELUND et al, 2015).

4.3 A linfadenite caseosa

A enfermidade é caracterizada por Williamson (2001) pela presença de lesões granulomatosas apresentando pus com consistência caseopurulenta a caseosa, de cor branco-esverdeado e inodoro. Sua transmissão ocorre através do conteúdo caseoso liberado por linfonodos rompidos espontaneamente, os quais contaminam o ambiente, fômites, alimentos e instalações, e a bactéria pode então entrar em outros hospedeiros por feridas ocasionadas pela tosquia, corte de cauda ou cordão umbilical (BLOOD, 1978). Unanian et al (1985) também atentam que o pastejo em áreas semiáridas como o nordeste brasileiro ocorre em meio a uma vegetação onde predominam cactáceas e caducifólias, propiciando assim um ambiente favorável para ocorrência de lesões na pele ou nas mucosas dos animais, desta forma facilitando a contaminação por diversos agentes patogênicos, entre eles o *C. pseudotuberculosis*. Bastos et al (2011) reafirmam a importância da transmissão por via respiratória, considerando a inexistência de granulomas superficiais em um rebanho ovino, e o surgimento de novos casos durante o período de três meses. A apresentação clínica da doença se faz de duas formas: superficial, quando se apresentam entumecidos linfonodos superficiais tais como parotídeo, submandibular, prescapular, poplíteo, prefemural e supramamário; e interna, que afeta tecidos linfáticos do fígado, pulmões, rins e baço. O período de incubação pode variar de 2 a 8 meses (ABDULLAH et al, 2017)

A PLD é considerada até agora o principal fator de virulência do *C. pseudotuberculosis*, sendo uma toxina que proteolisa a esfingomiélinina das células endoteliais dos vasos, aumentando a permeabilidade vascular após a infecção e conduzindo desta forma o agente infeccioso para o sistema linfático, onde se aloja nos linfonodos (CARNE e ONON, 1978). Um dia após a infecção, já surgem microabcessos no interior dos nódulos linfáticos, e em seis dias estes começam a se aglutinar, dando início à formação da massa caseosa esverdeada característica da patologia (FONTAINE e BAIRD, 2008). Ocorre um encapsulamento laminar concêntrico a fim de conter o processo inflamatório, porém pode ocorrer a necrose dessas lâminas, permitindo assim o rompimento desta contenção capsular e extravasamento do conteúdo caseoso (OSMAN et al, 2018).

Uma segunda proteína também tida como fator de virulência foi identificada posteriormente, e teve sua denominação relacionada ao seu peso molecular, a CP40, a qual foi testada como imunógeno em ovinos, demonstrando bom nível de proteção no grupo em que foi aplicada em maior concentração (WALKER et al, 1994). Shadnezhad et al (2016) reclassificaram-na como uma endoglicosidase, ao em vez de uma protease. Droppa-Almeida et al (2016), trabalhando com camundongos, observaram que a imunização com rCP40 induzia

ativação de células Th1, associada também a uma resposta humoral. A mesma conclusão foi obtida em um trabalho posterior novamente realizado em camundongos (DROPPA-ALMEIDA, et al, 2019).

Medidas preventivas simples já ajudariam muito na redução de casos nos rebanhos, tais como a desinfecção de fômites, tosquia realizada de forma correta e sem lesões, aplicação de injetáveis iniciados por animais mais jovens, limpeza e desinfecção de instalações, controle de ectoparasitas, e uso de instalações com baixo risco de causar lesões cutâneas. Mas a principal medida para uma verdadeira redução seria uma avaliação clínica minuciosa de novos animais adquiridos (ALVES et al, 2007), evitando dessa forma sua introdução no rebanho. A terapêutica mais adotada relatada na literatura é a remoção cirúrgica do conteúdo caseoso dos granulomas superficiais, com a posterior cauterização com tintura de iodo à 10% (LEITE, 2012; SANTIAGO et al, 2013; FARIAS et al, 2019). Existem, contudo, diversos trabalhos sugerindo alternativas terapêuticas ao uso da tintura de iodo, a qual, de acordo com Ballin e Pratt (2002), pode causar citotoxicidade.

Castilhos et al (2002) propõem um tratamento homeopático, porém sem uma conclusão objetiva; já Sellera et al (2016) testaram uma metodologia terapêutica fotodinâmica com bons resultados quanto ao tempo cicatrização. Da mesma forma, Kalil et al (2019) utilizaram uma pomada a base de própolis verde no tratamento, e Santos et al (2019) empregaram uma pomada a base de nanopartículas de prata. Ambos observaram diminuição do tempo de cicatrização e em casos de recidivas. Smith e Sherman, (2009) sugerem uso de formol a 10% no interior do granuloma, realizando inoculação da solução e posterior lavagem e retirada de conteúdo caseoso, mas admitem ser uma terapêutica controversa, pelo desconforto e risco aos animais.

A antibioticoterapia sistêmica já foi testada em diversos trabalhos, como o de Senturk e Temizel (2006), os quais obtiveram bons resultados com a administração intracapsular de rifamicina combinada à tetraciclina em ovinos. Entretanto, de acordo com Baird (2006), esta proposta terapêutica não avaliou a redução dos granulomas internos. O uso da tulatromicina subcutânea se mostrou parcialmente viável em um experimento com caprinos (WASHBURN et al, 2013), mas de um modo geral a antibioticoterapia sistêmica se faz ineficiente devido ao fato da cápsula nodular inviabilizar o acesso dos fármacos aos microrganismos.

O diagnóstico clínico, com a apalpação dos linfonodos superficiais entumecidos, é o mais cotidianamente feito por veterinários em campo, porém diversos trabalhos sugerem diagnósticos laboratoriais, devido à inespecificidade deste tipo de procedimento. Após a retirada cirúrgica do material caseoso, o isolamento da bactéria é o padrão-ouro para diagnóstico (CHIRINO-ZAGARRA et al, 2006; OREIBY, 2014), sendo que Ribeiro et al

(2001) realizaram punção aspirativa do conteúdo do linfonodo para obtenção de amostra. A identificação da presença do agente nas lesões também é demonstrada pelo método da Polymerase Chain Reaction (PCR) em outros trabalhos (ÇETINKAYA et al, 2002; PACHECO et al, 2007; NASSAR et al, 2015). Diferentes autores desenvolveram ensaios de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) utilizando antígenos nativos ou recombinantes para a detecção de anticorpos específicos (GUIMARÃES et al, 2011; HOELZLE et al, 2013; RIBEIRO et al, 2013; BARRAL et al, 2019), os quais permitiram o diagnóstico de animais assintomáticos, e Rebouças et al (2011) também testaram um método baseado na produção específica de interferon gama.

4.4 A profilaxia vacinal contra a linfadenite caseosa como alternativa de erradicação

O estudo da resposta imunológica induzida pela imunização é básico para o desenvolvimento de uma vacina mais eficiente. Citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF) e o interferon gama (IFN- γ) são importantes para a redução da disseminação bacteriana, dado que foi demonstrado em uma pesquisa com camundongos, a qual evidenciou inclusive que a primeira teria um maior destaque nessa ação (LAN et al, 1998). A maior produção de IgG2a indica uma maior ativação de células Th1 enquanto a IgG1 a de células Th2 em camundongos, sendo estes marcadores usados em trabalhos para identificação da natureza da resposta imune (FIRACATIVE et al, 2018). Vale et al (2016), ao estimularem imunologicamente camundongos, mostraram um aumento significativo de citocinas de perfil Th1 60 dias após do desafio, bem como uma importante resposta humoral representada por altos níveis de IgG2a e IgG1 específicas contra *C. pseudotuberculosis*. Uma resposta humoral significativa, tanto a nível sorológico como também colostrado, também foi observada após imunização em caprinos com bacterinas, demonstrando um possível efeito imunoprotetor subsequente ao estímulo imunogênico (AUAD et al, 2018).

Tanto o IFN- γ como a IL-4 desempenham papéis importantes na geração e regulação de respostas imunes, sendo que a primeira citocina promove a diferenciação e estabilidade de células Th2 e inibe a diferenciação de células Th1, o que inversamente ocorre com a segunda. Também as atividades de macrófagos induzidas ou aumentadas por IFN- γ são antagonizadas pela IL-4 (PALUDAN, 1998). Desta forma, a observação do nível de produção de uma das duas citocinas de ações antagonísticas pode indicar o perfil da resposta imunológica num determinado momento de um experimento.

Há décadas já se propõe uma solução vacinal para a linfadenite caseosa, sendo testados diferentes formulações antigênicas a fim de obter um resultado potencialmente imunoprotetor

para o rebanho. Cameron e Engelbrecht (1971) testaram o *C. pseudotuberculosis* inativado em camundongos, obtendo proteção parcial nos animais imunizados, sendo que no mesmo trabalho também testaram uma soroterapia e um transplante de macrófagos com fins terapêuticos. A idealização de uma vacina atenuando a *C. pseudotuberculosis* através da exclusão mutagênica do gene responsável pela codificação da PLD foi um marco no desenvolvimento de imunógenos contra a linfadenite caseosa. O experimento com ovinos testou a cepa geneticamente modificada (Toxminus), e obteve como resultado proteção parcial significativa (HODGSON et al, 1992).

Considerando a natureza intracelular obrigatória do agente infeccioso, alguns trabalhos se propõem utilizar cepas atenuada com propósito vacinal ainda na década atual, como o estudo de Lima et al (2017), que utilizou uma cepa naturalmente atenuada isolada no estado da Bahia, obtendo resultados parcialmente positivos. Mas diversos trabalhos indicam uma tendência no desenvolvimento de vacinas baseadas em biologia sintética, utilizando como imunógenos mutantes obtidos laboratorialmente e subunidades bacterianas específicas. Cepas mutantes induzidas de *C. pseudotuberculosis* foram utilizadas como imunizantes em murinos, sendo selecionada uma que proporcionou uma taxa de sobrevivência de 80% nos camundongos desafiados (RIBEIRO et al, 2014). Células recombinantes expressando a proteína CP40 de *C. pseudotuberculosis* foram usadas em um estudo vacinal em ratos com o propósito de testar um novo adjuvante oleoso, com posterior ativação de linfócitos auxiliares (CD4+) e citotóxicos (CD8+) (ROSLINDAWANI et al, 2016).

A mais de uma década, os estudos baseados em engenharia genética e desenho molecular já se faziam presentes no que tange à profilaxia contra a linfadenite caseosa pois, no fim dos anos 90, Simmons et al (1998) testaram duas cepas mutantes de *C. pseudotuberculosis* como imunógenos em ovinos, sendo em uma alterado o gene *aroQ* e em outra o gene que codifica a PLD. Os resultados se mostraram melhores com os animais imunizados com a segunda cepa geneticamente modificada. Hodgson et al (1999) também usando uma cepa geneticamente atenuada quanto à PLD, obtendo uma taxa de proteção de 44% nos ovinos desafiados. Já Chaplin et al (1999) usaram uma vacina de DNA baseada na sequência nucleotídica de PLD fusionada com CTLA-4, sendo comparada a uma vacina comercial, onde os resultados foram inferiores a esta vacina comercial.

A maioria dos estudos vacinais utilizando-se de técnicas de engenharia genética foi conduzida em modelo murino, como por exemplo o de Brum et al (2017), que usou como alvo imunogênico uma esterase da *C. pseudotuberculosis* e obteve uma taxa de proteção de 58,3%. Leal et al (2018) utilizaram *Mycobacterium bovis* BCG geneticamente modificado para

expressar a PLD na imunização de camundongos, e a taxa de sobrevivência dos animais desafiados foi de 88%. Utilizando a concepção de produção por mutações genéticas ou desenho molecular em vacinas contra linfadenite caseosa em pequenos ruminantes, podem ser elencadas várias propostas ao longo dos últimos vinte anos (**Tabela 1**), mas nenhuma delas utilizou a CP40, e muito menos fusionada ou associada à PLD.

Para tal fim, técnicas laboratoriais de purificação de subunidades bacterianas nativas estão sendo substituídas pela técnica de vacinologia reversa, a qual consiste na análise prévia do genoma bacteriano em busca de novos imunógenos, com posterior análise através de ferramentas de imunobioinformática, e expressão de forma recombinante (ABU-BOBIE et al, 2003). Infelizmente, a maioria das ferramentas de imunoinformática existentes hoje foi desenvolvida para espécie humana ou para modelo murino, e seu uso para outros animais ainda é um desafio. Mesmo assim, ao escolher utilizar algumas ferramentas, principalmente para detecção de epítomos, é levado em consideração que o sistema imunológico de alguns mamíferos tende a ter certas semelhanças, podendo assim ser usadas em propostas vacinais de caprinos e ovinos também (SILVA et al, 2021).

Tabela 1. Antígenos e eficácia de ensaios vacinais contra a linfadenite caseosa em ovinos, utilizando engenharia genética e desenho molecular. (Adaptado de PINHO et al., 2021).

Imunógeno	Proteção (%)	Referência
Cepas mutantes: <i>aroQ</i> e PLD	-	(SIMMONS et al., 1998)
Cepa mutante: PLD	44	(HODGSON et al., 1999)
DNA: CTLA-4 bovino -hIg- Δ PLD	70	(CHAPLIN et al., 1999)
Cepa mutante: PLD	56	
Cepa mutante: PLD	100	(FONTAINE et al., 2006)
Cepa mutante: PLD + BCG	66	
Cepa mutante: PLD + Atenuada (formalina)	100	(SELIM et al., 2010)
Cepa mutante: PLD + Atenuada (irradiada)	78	

5.0 Materiais e métodos

5.1 Fase de desenvolvimento *in silico*

5.1.1 Construção da sequência das proteínas de fusão MBP:PLD:CP4 e individualizadas

A expressão das proteínas rPLD e rCP40, e da proteína de fusão, teve como base as sequências já depositadas em banco de dados de ambas, sendo a de identificação WP_013240889.1A para PLD, e WP_138130220.1 para CP40. As proteínas PLD e CP40 tiveram substituição dos aminoácidos do sítio ativo, de forma que foi sintetizada a sequência contendo PLD H19A-H53A e CP40 D150A-D153A-E157A. O vetor usado para a clonagem das proteínas separadas foi o pET28a. Neste caso, as sequências do peptídeo sinal foram deletadas e um marcador de poli-histidina foi adicionado nos terminais.

Para a proteína de fusão foi utilizado o vetor pMAL-c2X (Plasmídeo #75286), o qual necessita da fusão do alvo com a proteína *Maltose Binding Protein* (MBP). A MBP já vem sendo descrita na literatura como uma proteína que tem ação adjuvante intrínseca (NI et al., 2014; GONG et al., 2015; WANG et al., 2015; LIU et al., 2017). Foi incluído um *linker* rígido EAAAKEAAAKEAAAKE entre as proteínas PLD e CP40 (AURORA et al., 1997; AMET et al., 2009, 2010; LU e FENG, 2008). A sequência GGENLYF foi adicionada entre a MBP e a PLD por ser um sítio de fácil clivagem pela protease TEV (Tobacco Etch Virus), caso seja necessária a remoção da MBP para estudos posteriores envolvendo imunodiagnóstico. O plasmídeo foi sintetizado pela empresa FastBio (FastBio Ltda, São Paulo, Brasil).

5.1.2 Observação dos modelos tridimensionais e estrutura proteica terciária

Para a construção dos modelos tridimensionais, como objetivo de escolher o melhor molde e avaliar a qualidade dos modelos gerados, foi utilizado o servidor Web Swiss Model (<https://swissmodel.expasy.org/>). Esta ferramenta busca por sequências depositadas no PDB (*Protein Data Base*) que apresentam estrutura cristalográfica definida, e permite encontrar modelos segundo as recomendações incluídas no *software*.

5.1.3 Análise de ancoragem em MHC I e em receptor Toll-Like 2 (TLR2)

As predições de ancoragem de epítomos em moléculas de MHC de classe I foi realizada no IEDB utilizando os métodos de predição NetMHCpan EL 4.1 (REYNISSON et al., 2020) e 2.22 (WANG et al., 2008). Foi analisada a predição da ligação de epítomos da proteína de fusão com alelos de MHC I específicos de bovinos (*Bos taurus* - BoLA-1:00901, BoLA-T2a e BoLA-

HD6), espécie filogeneticamente mais próxima a pequenos ruminantes e da qual se tem informações sobre suas moléculas de MHC.

A análise de predição da ligação entre a proteína de fusão MBP:PLD:CP40 e o receptor TLR2 (PDB 5d3i, com modificações) de camundongo foi realizada no *software* SwarmDock (<https://bmm.crick.ac.uk/~svc-bmm-swarmdock/>) (TORCHALA et al., 2013). As estruturas 3D da proteína de fusão e do receptor foram feitas utilizando o *software* Chimera (PMID: 15264254), e a representação das ligações foi realizada no *software* LIGPLOT v.2.2 (WALLACE et al., 1996).

5.2 Produção e análise da proteína

5.2.1 Clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes

A expressão das proteínas rPLD e rCP40 individualizadas seguiu o que foi descrito por Barral et al (2019), onde podem ser encontrados os resultados oriundos destes procedimentos. Brevemente, a proteína rPLD foi expressa em *E. coli* strain BL21 (DE3) pLysS. Após a transformação da *E. coli* com plasmídeos através de choque térmico, as células foram cultivadas até atingir a densidade óptica (DO) 600nm de 0,5-0,7, e induzidas com IPTG 0,3 mM por 16h a 20°C em meio LB suplementado com canamicina (34µg/mL). As células foram separadas por centrifugação a 8.000 x g por 10 min a 4°C, ressuspensas em tampão Tris-HCl 20mM pH 8,0 contendo NaCl 300mM, e lisadas em gelo com dez pulsos de sonicação de 15 segundos cada, usando um processador ultrassônico, e então centrifugadas a 15.000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi submetido a cromatografia de afinidade utilizando coluna de níquel imobilizado (GE, Illinois, EUA), sob condições nativas. Após concentração da proteína alvo, uma segunda etapa de filtração em gel foi realizada utilizando uma coluna Superdex G 75 10/300 GL (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Todas as etapas de purificação foram analisadas por géis SDS-PAGE a 12% e ensaios de Western blotting, usando anticorpo anti-poli-histidina para confirmar a expressão das proteínas alvo.

A proteína rCP40 foi expressa em *E. coli* BL21 (DE3) Star. O plasmídeo contendo a sequência codificadora da proteína foi introduzido por choque térmico na cepa, e a expressão foi induzida pela adição de 1 mM de IPTG ao meio de cultura, seguido de incubação em um agitador orbital (200 rpm) a 37°C por 3h. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em uma coluna de sepharose-níquel HisTrap™ (GE). A pureza foi determinada por 12% SDS-PAGE, e a concentração foi determinada através de um kit comercial baseado na metodologia do ácido bicinonínico (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA)

Para a proteína de fusão, a linhagem celular de *Escherichia coli* utilizada foi a Origami, ideal para expressão específica aqui desejada, pois como a proteína alvo possui diversas pontes dissulfeto presentes na porção referente à PLD em sua conformação nativa, essa linhagem é a que melhor favorece a expressão de proteínas com essa característica bioquímica. Inicialmente, 80 ng de vetor recombinante foram adicionados a 50 µL de solução contendo células competentes de *E. coli*. Essa mistura permaneceu no gelo durante 30 minutos, e então foi submetida ao choque de temperatura a 42 °C por 1 minuto, seguida de 2 minutos no gelo. Após esse procedimento, as bactérias foram submetidas à agitação de 250 rpm por 1 hora a 37 °C em meio líquido SOC. Em seguida, as bactérias foram selecionadas após cultivo em meio sólido seletivo Luria Bertani (LB) contendo ampicilina (100 µg/mL). As colônias obtidas foram inoculadas em tubos individuais contendo 10 mL de meio líquido LB seletivo (LB + ampicilina 100 µg/mL) sob agitação e aeração constantes, e utilizadas para expressão em pequena escala.

Visando encontrar a condição ideal de expressão da proteína alvo para obtenção do maior rendimento de proteína solúvel pura por litro de cultura, inicialmente 5 mL de pré-inóculo foram transferidos para um novo tubo contendo 100 mL de meio LB líquido seletivo. As amostras foram mantidas sob agitação e aeração até atingir densidade óptica (DO) 600 nm entre 0,4 e 0,6 para posterior indução da expressão com IPTG. A absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro Biomate 3S (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Após atingir essa densidade óptica, a cultura contendo o vetor foi induzida com diferentes concentrações de IPTG (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 e 0,7 mM) e sob diferentes temperaturas (18, 20, 30 e 37 °C) a fim de obter proteínas na fração solúvel após a sonicação. Após 5 e 16 h de indução, as amostras coletadas foram centrifugadas a 5.000 \times g durante 10 minutos a 4 °C, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados ressuspensos em tampão de lise celular com variações no pH, concentrações salinas, diferentes íons isolados ou combinados, diferentes concentrações de glicerol, DTT e detergentes. Após sonicação, 5 µL de cada amostra foram aplicados em SDS-PAGE 15% e nomeados fração total; posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 15.000 \times g por 30 minutos a 4 °C, e 10 µL do sobrenadante de cada amostra foram aplicados em SDS-PAGE 15%, e nomeado então fração solúvel. A avaliação dos resultados foi feita *Western blot* usando anticorpos anti-cauda de histidina.

5.2.2 Western blot e produção em escala

Para a detecção da expressão da proteína de fusão, as amostras oriundas da expressão recombinante e das etapas de purificação foram misturadas com tampão de amostra e aplicadas em gel SDS-PAGE 12%. As proteínas, contidas no gel foram transferidas para a membrana de

nitrocelulose a partir de um eletrotransferidor (*Mini TransBlot Electrophoretic Transfer Cell* Bio-Rad, Califórnia, EUA) operando sob voltagem constante (100 V) por 1 hora. O tampão de transferência utilizado foi o Tris-Glicina (Tris 0,025 M, Glicina 0,192 M) contendo metanol 20%. A membrana foi incubada com anticorpo monoclonal anti-poli-histidina diluído 1:10.000 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), e posteriormente com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) diluído 1:30.000. A detecção da reação antígeno/anticorpo foi feita com solução de BCIP/NBT (5-bromo-4chloro-3-indolylphosphate/nitro-bluetetrazolium) até o aparecimento do resultado da reação (coloração azul púrpura), que ocorre apenas na presença da fosfatase alcalina. As amostras que apresentaram reação positiva na fração solúvel (expressão em pequena escala) foram utilizadas em experimentos de expressão e purificação em larga escala. Após a purificação em larga escala, novamente foi realizado o *Western blot* para confirmar a purificação da proteína alvo.

Para a produção em larga escala, as células transformadas foram cultivadas por 16 horas a 37 °C em meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL), e posteriormente essas culturas foram diluídas 100 vezes em meio LB fresco contendo antibiótico e incubadas a 37 °C até atingir OD 600 nm entre 0,4 e 0,6. A indução da expressão foi realizada a 20 °C e com 0,4 mM de IPTG. Após a expressão, a cultura foi centrifugada a 8.000 \times g e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspenso em tampão de lise celular. Após a adição do tampão, as células foram submetidas ao processo de lise celular por sonicação (4 pulsos de 40 segundos), e centrifugadas a 15.000 \times g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado para a realização das etapas de purificação.

5.2.3 Purificação da proteína alvo

A primeira etapa de purificação da proteína de fusão foi por cromatografia de afinidade em Ni-Sepharose (GE *Healthcare Life Sciences*, Illinois, EUA). Posteriormente, foi realizada cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex G75 10/300 (GE *Healthcare Life Sciences*), utilizando o sistema AKTA-pure.

A purificação em coluna de afinidade utilizando resina Ni-Sepharose (GE *Healthcare Life Sciences*, Illinois, EUA) foi realizada conforme instruções do fabricante. Primeiramente, um volume de 2 mL da resina foi adicionado a cada coluna de cromatografia de afinidade, as quais foram equilibradas com o mesmo tampão utilizado no processo de lise das células cultivadas. Em seguida, cada coluna de purificação (Bio-Rad, Califórnia, EUA) foi carregada com o sobrenadante do lisado celular obtido após centrifugação, para que as proteínas fossem adsorvidas. Após adsorção, a resina foi lavada utilizando tampões de lavagem com aumento

gradativo da concentração de imidazol (**Tabela 2**), buscando remover contaminantes adsorvidos de forma inespecífica. Por fim, as proteínas foram eluídas utilizando tampão de eluição com 400 mM de Imidazol. Todas as amostras obtidas por meio das diferentes lavagens com variações crescentes na concentração de Imidazol foram coletadas e analisadas em gel de SDS-PAGE 12%, para verificar em qual delas a proteína alvo foi eluída.

Tabela 2. Tampões utilizados para a purificação por cromatografia de afinidade por íons imóveis em coluna de purificação contendo resina Ni-Sepharose.

Tampão	Volume
Lise: 50 mM NaH ₂ PO ₄ + 400 mM NaCl + 10 % glicerol + 10 mM Imidazol + 1 mM MgCl ₂	10 mL
Lavegem 1: 50 mM NaH ₂ PO ₄ + 400 mM NaCl + 10% glicerol + 40 mM Imidazol + 1 mM MgCl ₂	10 mL
Lavegem 2: 50 mM NaH ₂ PO ₄ + 400 mM NaCl + 10% glicerol + 60 mM Imidazol + 1 mM MgCl ₂	10 mL
Lavegem 3: 50 mM NaH ₂ PO ₄ + 400 mM NaCl + 10% glicerol + 80 mM Imidazol + 1 mM MgCl ₂	5 mL
Eluição: 50 mM NaH ₂ PO ₄ + 400 mM + 10% glicerol + 400 mM imidazol + 1 mM MgCl ₂	10 mL

*Volume de tampão para cada 1 L de meio de cultura LB.

As amostras contendo a proteína alvo, obtidas a partir da purificação por cromatografia de afinidade, foram concentradas em dispositivos para concentração em centrífuga (Amicon Ultra Centrifugal Filters - 10 kDa) e submetidas à segunda etapa de purificação por gel filtração em coluna Superdex G75 10/300 (GE *Healthcare Life Sciences*), equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM e MgCl₂ 21 mM pH 7,5, utilizando o sistema AKTA-pure (GE *Healthcare Life Sciences*). As amostras referentes aos picos do cromatograma foram coletadas e analisadas por meio do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%) e *Western blot*.

5.2.4 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

As amostras foram avaliadas por meio de ensaios de DLS em aparelho Zetasizer Nano series S90 (Malvern Instruments, Malvern, UK) a fim de obter informações sobre o estado oligomérico e polidispersividade das amostras proteicas. Para a realização dos experimentos, 50 µM de cada amostra foram previamente centrifugados por 30 minutos a 14.000 x g a 10 °C. As medidas de DLS foram realizadas utilizando o *software* Zetasizer e a aquisição de dados foi feita a partir de 10 ciclos de 30 segundos em temperatura constante de 25 °C.

5.2.5. Espectroscopia de dicroísmo circular

Para verificar a conformação da proteína expressa, uma espectroscopia de dicroísmo circular foi realizada em um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco, Oregon, EUA) com um

sistema de controle de temperatura do tipo Peltier. O espectro UV-CD da proteína de fusão MBP-PLD-CP40 foi coletado de 260 a 197 nm a 25°C em uma cubeta de quartzo de 0,05 cm. Foi utilizada uma velocidade de varredura de 50 nm/min com tempo de resposta de 1,0 s, largura de banda espectral de 1,0 nm e resolução espectral de 0,1 nm. A média do sinal foi calculada em 10 varreduras. Cada espectro foi adquirido independentemente duas vezes. A proteína foi diluída para 5 µM em 20 mM Tris e 100 mM NaCl, pH 7,4. A contribuição do tampão foi subtraída dos espectros de proteína. As porcentagens da estrutura secundária em solução foram calculadas com o software CONTINLL do pacote CDPro, utilizando o conjunto de referência de proteínas SP43.

5.3 Animais dos grupos experimentais

Vinte e sete ovinos sem raça definida, de ambos os sexos, com idade de até 3 meses sorologicamente negativos, foram mantidos na Fazenda Experimental da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMEVZ) da UFBA na localidade de São Gonçalo dos Campos. Os animais receberam diariamente ração farelada balanceada e silagem de capim, além de água *ad libitum*. Todos os cuidados foram tomados para garantir o bem-estar animal, e os experimentos envolvendo os ovinos foram realizados por médico veterinário treinado e licenciado (CRMV-BA 2060). Os animais foram vermifugados 45 dias antes do começo dos experimentos. Este estudo foi aprovado sob o registro de número 19/2021 pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Experimentação da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA.

5.4 Imunização e desafio

No dia zero, os nove animais do grupo 1 (Controle - G1), foram inoculados com 1ml de solução salina estéril; os nove ovinos do grupo 2 (G2) foram inoculados com 200 µg proteína de fusão PLD:CP40:MBP (G2) diluídos em 400 µL de solução salina estéril e 600 µl do adjuvante Montanide ISA 61 VG (Seppic, New Jersey, USA); os nove animais do grupo 3 (G3) foram inoculados com a associação de 100 µg de rPLD e 100 µg de rCP40 (G3) diluídos em 400µL de solução salina estéril junto à 600µL do mesmo adjuvante do grupo anterior. Quatro semanas após, o grupo 1 recebeu uma dose de solução fisiológica, e o grupos 2 e 3 uma segunda dose dos respectivos imunógenos. Duas semanas após a última inoculação, todos os animais foram desafiados individualmente com a inoculação de 1×10^4 UFC da cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis* (LEAL et al, 2018). O desafio foi realizado na prega cutânea da axila esquerda dos animais por via subcutânea.

5.5 Avaliação clínica e coleta de material

Antes das imunizações, foi aferida a temperatura retal dos animais, bem como também foram avaliadas as condições clínicas através da observação de mucosas, existência de secreções anormais, e prostração. Antes do desafio no dia zero e nas 2^o, 4^o, 6^o e 8^o semanas do período experimental, foram coletados 10 mL de sangue em tubo a vácuo com anticoagulante heparina de 5 animais de cada grupo. Também foram coletados 3,5 mL de sangue em tubo a vácuo sem anticoagulante dos demais animais de cada grupo nesse mesmo período e deste mesmo modo, nas 10^o e 12^o semanas em todos os animais do experimento. Este material foi enviado ao Laboratório de Imunologia (LABIMUNO ICS/UFBA), para as análises sorológicas e de imunologia celular. Também foram avaliadas semanalmente ao longo do experimento possíveis reações adversas no local da inoculação de cada animal e, através de apalpação, o entumescimento dos linfonodos superficiais. Seguindo o protocolo de Kalil et al (2019), o material caseoso desses granulomas superficiais entumescidos foi coletado e levado para avaliação microbiológica e análise por Multiplex PCR (PACHECO et al, 2007). O procedimento cirúrgico para a coleta foi devidamente tratado com tintura de iodo à 10%.

5.6 Necropsia dos animais

Durante nove semanas após o desafio, os animais foram avaliados semanalmente para verificação de desenvolvimento de lesões características de linfadenite caseosa, sendo então posteriormente encaminhados a abatedouro com registro oficial. Este procedimento foi realizado nas instalações do frigorífico FrigBahia, localizado no município de Pintadas, estado da Bahia, e desta forma todo o procedimento foi feito de acordo com as normas sanitárias e de bem-estar animal inerentes à linha de abate do frigorífico. Foram coletadas amostras de linfonodos e órgãos internos que apresentaram alterações para verificação microbiológica da presença de *C. pseudotuberculosis*, como também para avaliação histopatológica destes órgãos, os quais foram analisados no Laboratório de Patologia Veterinária do Hospital de Medicina Veterinária Prof. Renato Rodenburg de Medeiros Neto (HOSPMEV) da UFBA, através da confecção de cortes histológicos corados pela técnica de hematoxilina e eosina, e posterior análise em microscopia óptica. Os cortes foram avaliados por patologistas veterinários.

5.7 Análises laboratoriais

5.7.1 ELISA para verificação da resposta imune humoral dos animais

Para avaliação da produção de anticorpos pelos animais nos diferentes tempos de coletas, placas de ELISA foram revestidas com 100 µl de rPLD e/ou rCP40, a uma concentração de 2,5 µg/ml cada em tampão carbonato bicarbonato pH 9,6, a 4°C por 16 h. As placas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em PBS acrescido de 0,5% de Tween 20 (PBS-T). Amostras de soro diluídas 1:400 em PBS-T-1% de leite desnatado foram então aplicadas a 100 µl/poço e incubadas a 37°C por 1 h. Após seis lavagens com PBS-T, um anticorpo anti-IgG ovina conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído 1:10.000 em PBS-T 1% de leite desnatado foi aplicado nas placas, que foram incubadas a 37°C por 45 minutos. Após cinco lavagens adicionais com PBS-T, a reação foi desenvolvida com uma solução de OPD (ortofenilenodiamina) e peróxido de hidrogênio por 10 min, parada com ácido sulfúrico 2N (H₂SO₄), e então lida a 492 nm em espectrofotômetro (ThermoFisher).

5.7.2 Ensaio de produção de IFN-γ e IL-4 específico

O sangue total coletado dos animais em tubos com anticoagulante foi aplicado na quantidade de 1 mL/well em placas de cultura estéreis de 24 wells. As células foram estimuladas com o mitógeno concanavalina A a 10 µg/mL como controle positivo, com as proteínas rPLD e rCP40 (10 µg/mL de cada), ou com água estéril como controle negativo. As placas foram então incubadas em estufa com suprimento de 5% de CO₂ a 37 °C por 48h, centrifugadas a 2000 x g a 4 °C por 10 min, e o sobrenadante foi coletado e guardado em freezer a -20 °C.

A quantificação da produção específica de IL-4 e de IFN-gama foi realizada utilizando as amostras de sobrenadante do cultivo, e kits específicos de ELISA sanduiche para quantificação das citocinas (Bovine IFN-γ ELISA e Bovine IL-4 ELISA, Msbtech, Uppsala, Suécia). O procedimento foi realizado de acordo com o especificado pelo fabricante.

5.7.3 Análises microbiológica e molecular do material caseoso coletado *ante-mortem* e na necropsia.

Após a coleta das amostras do material caseoso dos granulomas entumecidos ao longo do experimento e durante a necropsia, este material foi resfriado e transferido para o Laboratório de Imunologia (ICS/UFBA), para as análises microbiológicas onde foi semeado em meio Brain Heart Infusion (BHI) Ágar adicionado de 5% de sangue ovino, e incubado por

24-72 horas. Após isolamento bacteriano, o DNA genômico foi extraído das colônias, e analisado seguindo a metodologia de Multiplex PCR, como descrito por Pacheco et al (2007).

5.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 6 (GraphPad Software, San Diego, CA). Foram comparadas a produção de anticorpos e de citocinas entre os grupos experimentais. Primeiramente foi avaliada a homogeneidade dos resultados através do teste Kolmogorov–Smirnov, podendo levar a dois caminhos de análise: (1) resultados não-paramétricos, quando foram realizados os testes de variância Kruskal–Wallis e o teste de Mann–Whitney; (2) resultados paramétricos, quando foram realizados os testes de variância *one way* ANOVA seguido do teste de Tukey. Foram consideradas como significativas as diferenças entre os grupos quando $p < 0,05$.

6. Resultados

6.1 Análises imunobioinformáticas da proteína de fusão PLD:CP40:MBP

6.1.1 Sequência de aminoácidos da proteína de fusão

Os resultados referentes à sequência de aminoácidos da proteína de fusão MBP:PLD:CP40, se encontram na **Tabela 3**. Pode-se verificar que as sequências da proteína estão na seguinte ordem: primeiramente a MBL, depois a PLD, e por último a CP40. Verifica-se também o link rígido entre as proteínas PLD e CP40, e a cauda de histidina, adicionada para propiciar a posterior purificação.

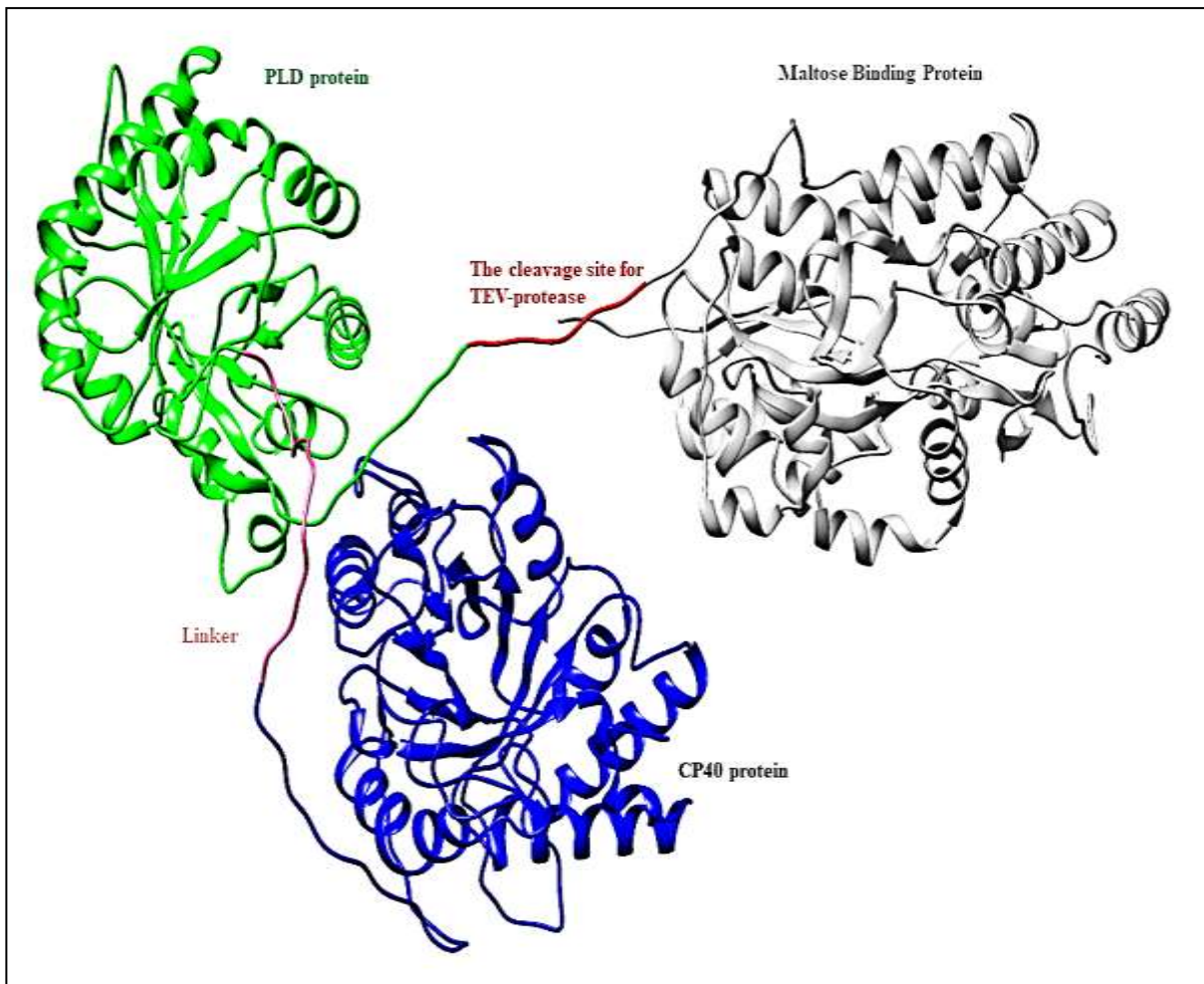
Tabela 3. Sequência de aminoácidos da proteína de fusão MBP:PLD:CP40. Em destaque, a *Maltose Binding Protein* (cinza), o sítio de clivagem para a TEV-protease (grifado), a proteína PLD de *C. pseudotuberculosis* (verde), o linker rígido (rosa), a proteína CP40 de *C. pseudotuberculosis* (azul), e a cauda de histidina (amarelo).

Aminoacid sequence
MKIEEGKLVWINGDKGYNGLAEVGGKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGD
GPDIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEA
LSLIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAF
KYENGKYDIKDVGVNAGAKAGLTFLVDLKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMT
INGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLEN
YLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAF
WYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTNSSSSNNNNNNNNNNNLGIEGRGGENLYFQS
MASPASTANRPVYAIAARVLTQGVDDAVAIGANALEIDFTAWGRGWADADGIPT
SAGATAEEIFKHIADKRKQGANITFTWLDIKNPDYCRDARSVCSINALRDLARKYLEP
AGVRVLYGFYKTVGGPAWKTITADLRDGEAVALSGPAQDVLNDFARSENKILTKQK
IADYGYNINQGFNCYGTWNRTCDQLRKSSEARDQGKLGKTFGWTIATGQDARV
NDLLGKANVDGLIFGFKITHFYRHADTENSFKAIKRWVDKHSATHHLATVADNPWE
AAAKEAAAKEAAAKEPADLSQAPLKASPGHADKVGVTTCDAKPIFFGYRTWRD
KAIQLKDDDPWKDKLQVKLTDIPEHVN MVSLFHVEDNQKSDDQFWETFRKEYQPKL
KERGTRVVRTVGAQLLLNKIKEKGLYGRSVEDDYKYREIARDIYKKYVTDHNLAGL
AVDMALRKVEKRIDLQWQLRKIMGAFSELMGPKAPANEGKKPGHEGYKYLIYDTFD
NAQTSQVGLVADLVVLAQTYDKGTKESIDQVWNGFRDKINSCQFMAGYAQPEE
NDTNRFLTAVGEVNKSGAMQVAEWKPDNGVKGGTFAYALDRDRGRTYDGGDFTTL
KPTDFAFTKRAIELTTGESSTDLGKATGSRGHHHHHH

6.1.2 Estrutura 3D da proteína de fusão PLD:CP40:MBP

Uma representação 3D da proteína de fusão é demonstrada na **Figura 1**. Nesta representação 3D, verifica-se que o link rígido foi capaz de distanciar a PLD da CP40, além do que a MBP se apresenta de forma mais afastada das duas proteínas.

Figura 1. Estrutura 3D da proteína de fusão MBP:PLD:CP40. A estrutura em três dimensões foi representada através do *software* Chimera. Apresenta-se a MBP em cinza, sítio para a protease TEV em vermelho, PLD de em verde, o *linker* rígido em rosa e a CP40 em azul.



6.1.3 Ancoragem da proteína de fusão em MHC I

Entre os epítomos analisados para a predição de ligação com MHC de classe I no software IEDB, só foi possível realizar a análise para ligação de epítomos com MHC I de bovino taurino devido a uma limitação do servidor de não possuir sequências de MHC II para essa espécie, e de nenhuma das duas classes para ovinos e caprinos. As sequências apresentadas representam as de maior probabilidade de ancoragem com todos os alelos das moléculas testadas (**Tabela 4**). Foram selecionadas as sequências a partir do início da sequência da PLD (posição 400) por ser o início da sequência do alvo que se tem interesse para apresentação de epítomos específicos de *C. pseudotuberculosis*, excluindo assim as sequências pertencentes à MBP que se apresenta apenas como adjuvante.

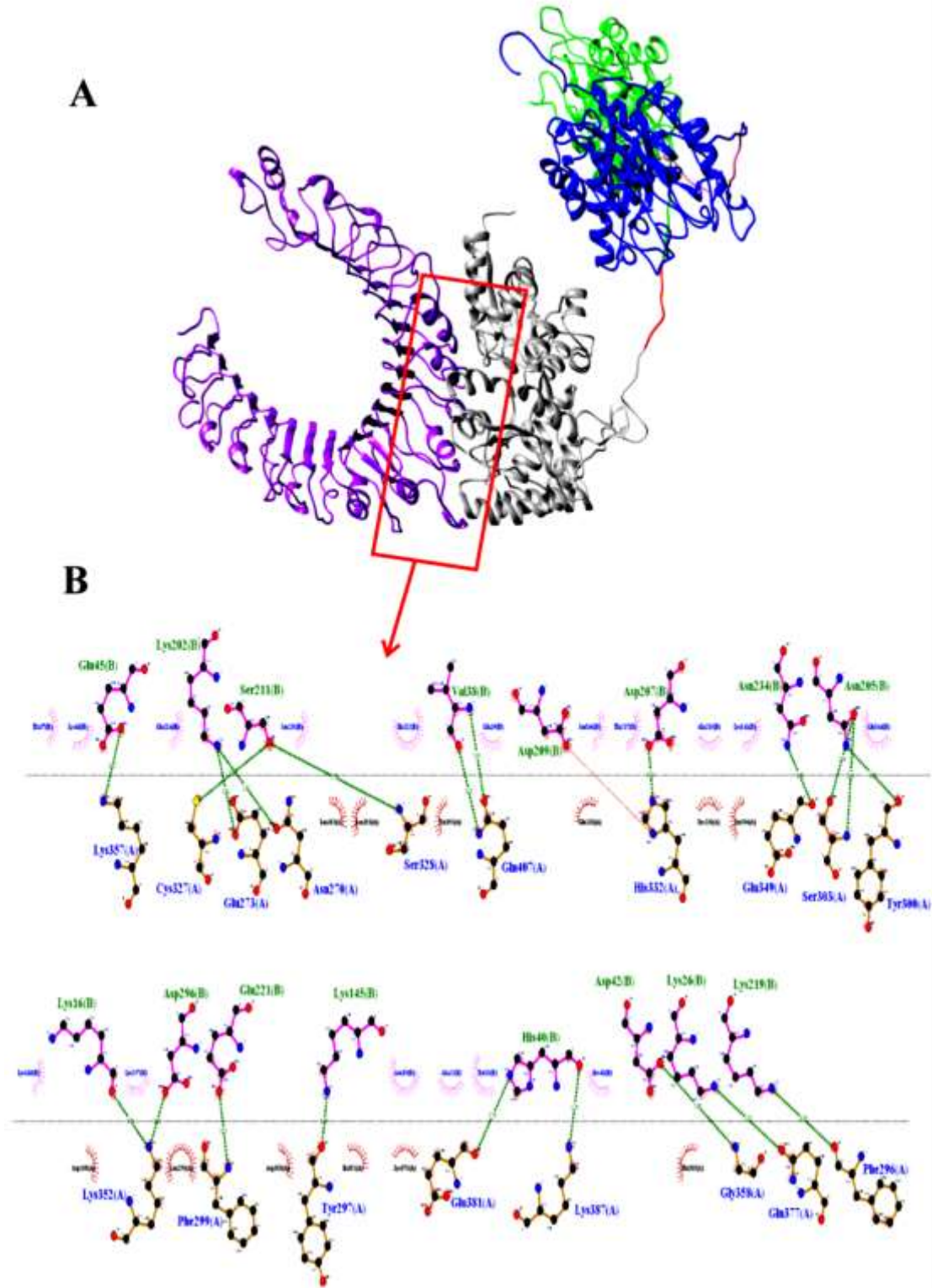
Tabela 4. Sequências com maior probabilidade de ligação com MHC I de bovino (*Bos taurus*). As regiões de início e fim de cada sequência delimitam a qual das proteínas da proteína de fusão MBP:PLD:CP40 elas pertencem.

Proteína	Início	Fim	Sequência
PLD	400	408	ASTANRPVY
	455	463	ATAEEIFKH
	498	506	ALRDLARKY
	555	563	RSENKILTK
	632	640	LIFGFKITH
	652	660	KAIKRWVVK
CP40	756	764	HVNMVSLFH
	798	806	VGAQLLNK
	843	851	LAVDMALRK
	983	991	GVKGGTFAY

6.1.4 Ancoragem da proteína de fusão MBP:PLDCP40 no receptor TLR2

A **Figura 2** mostra a representação da ancoragem da proteína de fusão com o receptor Toll-Like 2. Através das análises realizadas no servidor SwarmDock, foi possível confirmar que a proteína de fusão MBP:PLD:CP40 possui várias regiões de ancoragem com o receptor TLR2 (**Figura 2A**). É possível demonstrar as ligações que ocorrem entre a proteína MBP e o receptor (**Figura 2B**), onde as linhas verdes representam ligações de hidrogênio e semicírculos representam interações hidrofóbicas.

Figura 2. Ancoragem da proteína MBP:PLD:CP40 com o receptor TLR2. Visualização da estrutura gerada pelo software Chimera. **(A)** TLR2 (receptor) em roxo e a proteína MBP:PLD:CP40 (ligante) com a MBP (cinza), sítio para a protease TEV (vermelho), PLD (verde) *linker* (rosa) e CP40 (azul). **(B)** Estruturas de ligação da proteína MBP:PLD:CP40 com o receptor TLR2. Interações de resíduos entre as proteínas fornecidas pelo software LIGPLOT v.2.2. As linhas verdes representam ligações de hidrogênio, semicírculos denotam interações hidrofóbicas.



6.1.5 Clonagem, expressão e purificação

Após transformação das linhagens Origami de *E. coli* com o plasmídeo contendo a sequência da proteína de fusão MBP:PLD:CP40, realizou-se os procedimentos para superexpressão da proteína de fusão em larga escala e posterior purificação. A pureza das amostras foi avaliada em quatro condições de lavagem (**Figura 3**) contendo 40 mM, 60 mM, 80 mM e 400 mM de imidazol. Através da técnica de *Western blot*, pôde-se avaliar que a proteína em questão é a proteína alvo, devido a ligação do anticorpo anti-poli-histidina e peso molecular esperado (**Figura 4**).

Figura 3. SDS-PAGE 15% evidenciando a purificação por cromatografia de afinidade da proteína de fusão MBP:PLD:CP40. Foram feitas lavagens com diferentes concentrações de Imidazol 40 mM (40); 60 mM (60); 80 mM (80), e eluição com 400 mM (E). As setas pretas indicam a presença das respectivas proteínas e a letra “M” corresponde ao marcador molecular, em kDa. Os números ao lado correspondem aos valores de peso molecular do padrão, em kDa.

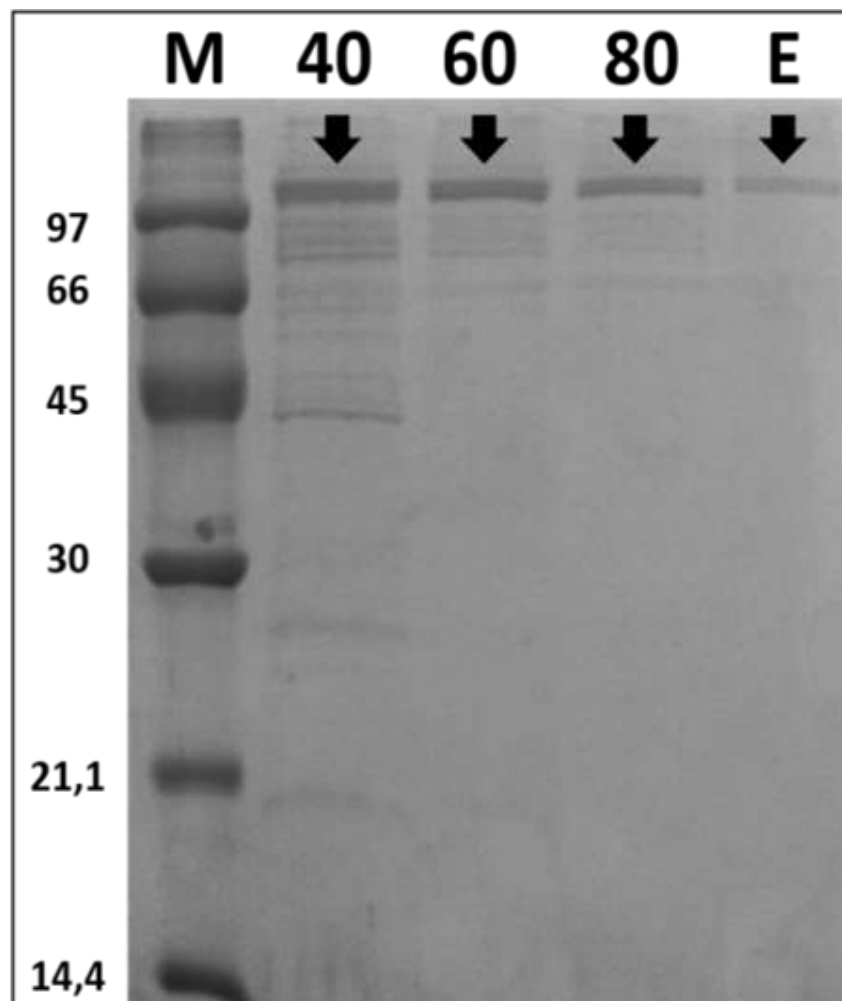
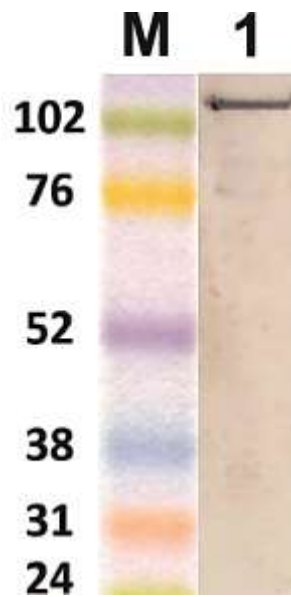
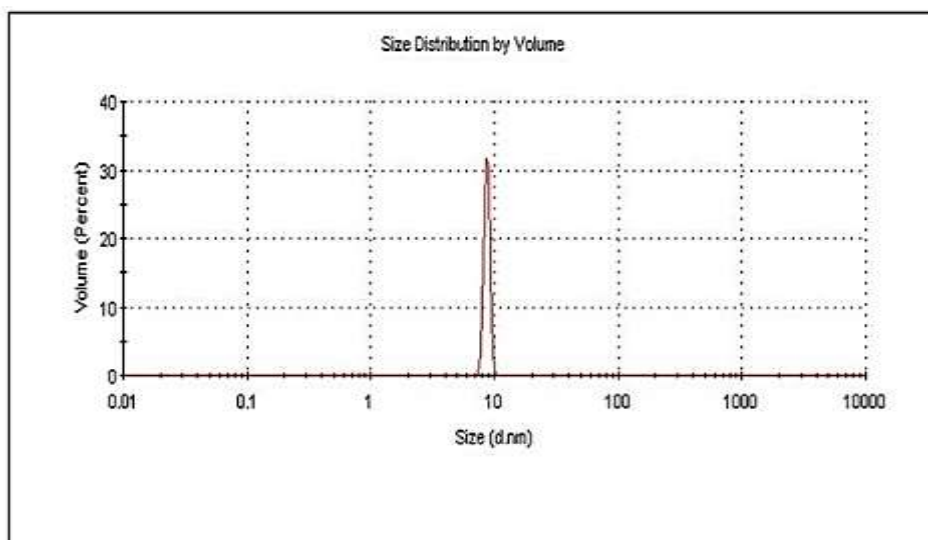


Figura 4. Western blot utilizando anticorpo anti-poli-histidina. M - Marcador molecular. Os números ao lado representam os pesos moleculares do padrão, em kDa (M).



A análise por espalhamento dinâmico de luz mostrou que a proteína estava monodispersa e livre de agregados proteicos (**Figura 5**). Em seguida, as amostras foram dialisadas utilizando tampão 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,5 mM EDTA e 1mM DTT em uma temperatura constante de 4 °C, por meio da membrana de diálise Fischerbrand (MWCO 6.000-8.000). Primeiramente, foram realizadas duas diálises de quatro horas cada, e posteriormente, essas amostras foram dialisadas por 24 horas, obtendo-se as amostras finais para utilização em ensaios vacinais posteriores.

Figura 5. Plotagem gráfica da análise de DLS da proteína de fusão. Foram utilizados 10 ciclos de 30 segundos em temperatura constante de 25 °C.



A análise de dicroísmo circular pode demonstrar o devido enovelamento da proteína já expressa. A **Figura 6** demonstra o resultado direto da análise, onde se verifica a correlação entre o comprimento de onda e sua elipticidade molar. A **Tabela 5** mostra a porcentagem de frações de estrutura secundária da proteína de fusão MBP-PLD-CP40, e a **Figura 7** traz uma representação tridimensional do enovelamento, de acordo com estes resultados.

Figura 6. Espectro CD-UV característico da proteína de fusão MBP:PLD:CP40, a 25°C em Tris 20 Mm e NaCl 100 mM (pH 7,4). O eixo y do gráfico corresponde à elipticidade molar em $10^3 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$.

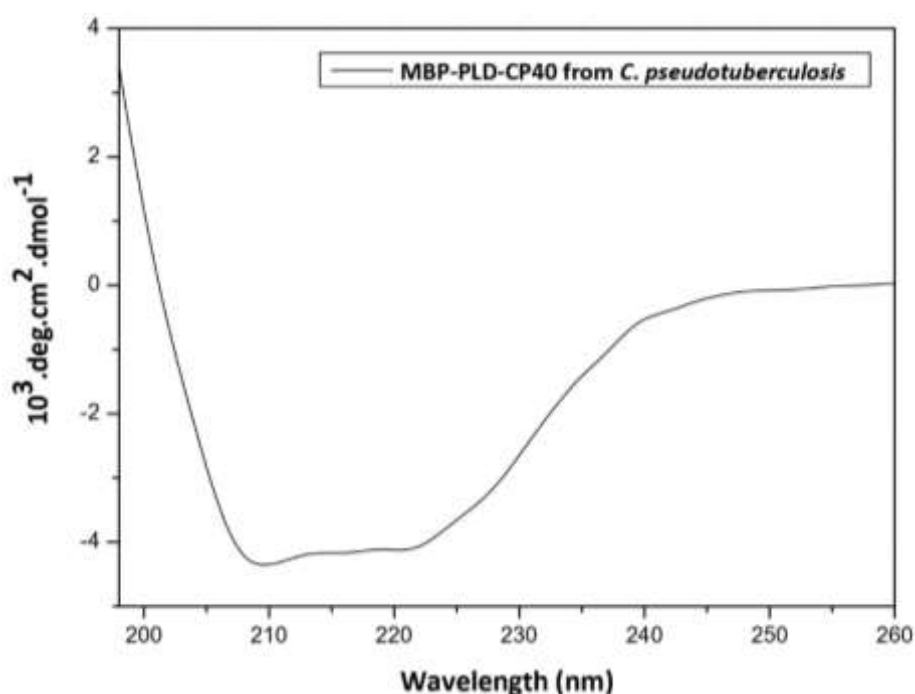
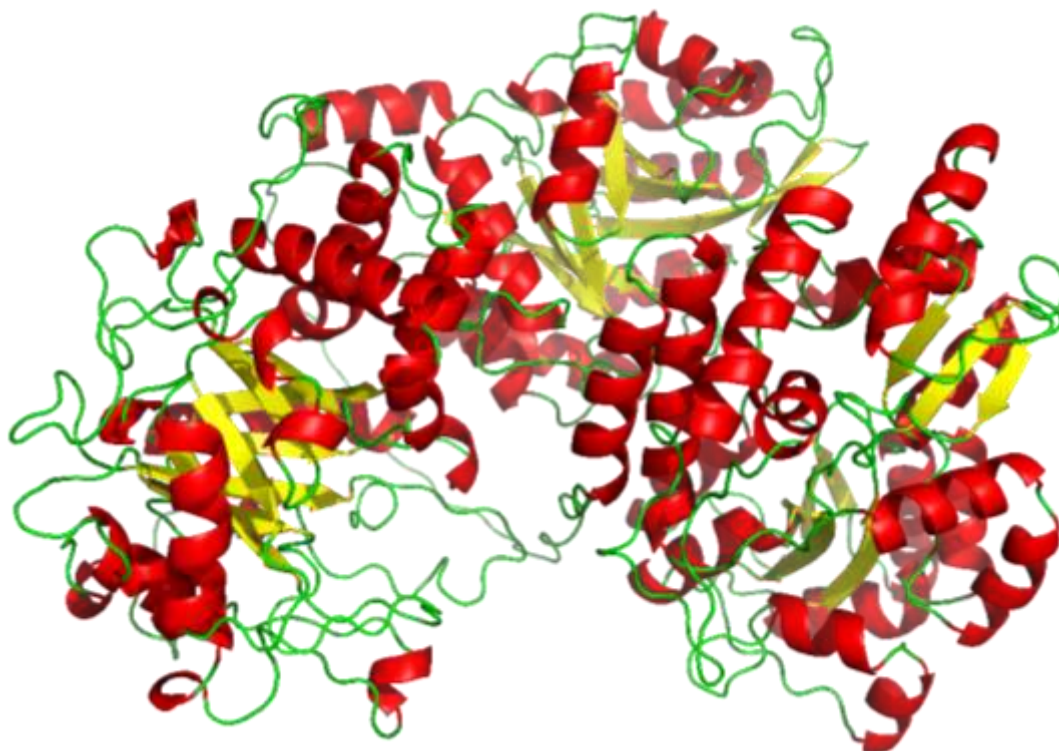


Tabela 5. Porcentagem de frações de estrutura secundária da MBP-PLD-CP40 quimérica de *C. pseudotuberculosis*, obtidas através de experimentos UV-CD. A deconvolução e o cálculo das porcentagens de estrutura secundária foram realizados pelo software CONTINLL do pacote de software CDPro usando o conjunto de referência de proteína SP43. Os resultados descritos acima indicam que a proteína quimérica MBP:PLD:CP40 é dobrada e adequada para a realização de ensaios biológicos. RMSD - root-mean-square deviation; NRMSD - normalized root mean square error deviation.

Estrutura	α -helix	β -sheet	Turn	Unrd	RMSD	NRMSD
%	19.6	30.4	20.8	29.2	0.016	0.016

Figura 7. Modelo da MPB:PLD:CP40 quimérica usando a versão AlphaFold-multímero do ColabFold (EVANS et al., 2021). O modelo estrutural da proteína quimérica foi representado em um desenho mostrando as folhas β (amarelo), α -hélices (vermelho) e alças (verde).



6.2 Avaliação clínica dos animais

Os animais se apresentaram, tanto antes, após a primeira dose como no reforço, com coloração de mucosa normal, sem apresentação de secreções anormais e com estado comportamental e corpóreo normais. As médias da temperatura retal apresentadas foram 39,5°C, 39,6 °C e 39,4°C após a primeira aplicação, e 39,2°C, 38,8°C e 38,7°C após dose de reforço para os grupos G1, G2 e G3 respectivamente. Ao longo de nove semanas após o desafio, foram quantificados os granulomas em linfonodos superficiais que apareceram nos animais de cada grupo, gerando uma taxa de redução de 76,9% e de 92,4% nas ocorrências nos grupos G2 e G3 respectivamente, em relação ao grupo controle (**Tabela 6**). Esses granulomas superficiais se apresentaram em linfonodos próximos ao local de administração do desafio, como linfonodos axilares, axilares acessórios, esternais, e pré-escapulares, mas em um animal do grupo G2 a ocorrência foi no linfonodo parótideo, do mesmo lado da administração.

Tabela 6 – Número de lesões granulomatosas em linfonodos superficiais nos animais de cada grupo experimental. Ao longo de nove semanas após o desafio, o número de ocorrências de lesões foi quantificado. Todas as lesões tiveram identificação positiva de *C. pseudotuberculosis* por Multiplex PCR.

SEMANAS GRUPOS	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	TOTAL	REDUÇÃO (%)
CONTROLE	-	-	-	-	1	2	1	5	4	13	-
FUSÃO	-	-	-	2	-	1	-	-	-	3	76,9
rPLD+rCP40	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	92,4

6.3 Necropsia dos animais

Na necropsia dos animais, foram encontrados seis linfonodos em seis animais com conteúdo granulomatoso no grupo controle, um no grupo G2, e um no grupo G3. Em órgãos, foram encontradas lesões multifocais em pulmões de dois animais do grupo controle, e de dois animais do grupo G2.

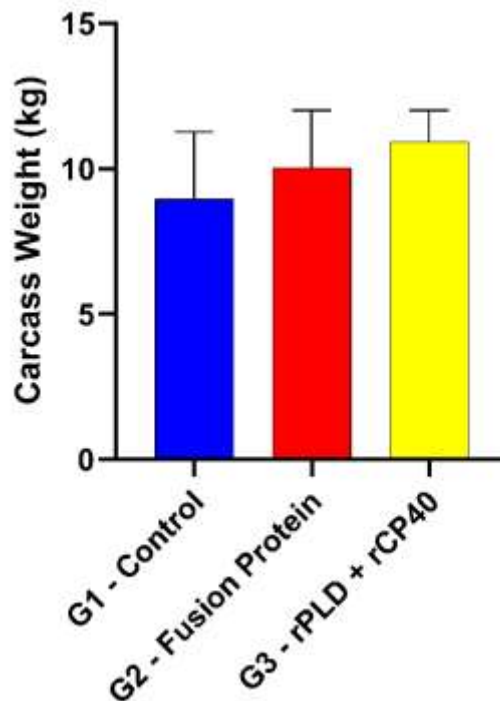
Quando avaliadas as lesões encontradas durante nove semanas pós desafio e na necropsia, o grupo controle totalizou vinte e uma ocorrências, contra cinco do G2, e dois do G1 (**Tabela 7**). No cômputo geral considerando os granulomas superficiais tratados *ante-mortem*, a redução de lesões nos animais dos dois grupos imunizados quando comparado ao grupo controle foi de 71,42% no G2 e 90,4% no G3, e não apresentaram lesões 33,3% dos animais no G2, e 77,7% no G3. Todos os animais do grupo controle apresentaram lesões. O conteúdo das lesões foi analisado por Multiplex PCR, e foi encontrado fragmentos de DNA específicos da bactéria em todos eles.

Tabela 7 – Comparação do número de lesões granulomatosas nos animais dos grupos experimentais, *ante-mortem* e na necropsia. Todas as lesões tiveram seu conteúdo granulomatoso coletado, e todas deram reação positivas em Multiplex PCR

ID	ANTE-MORTEM	NECROPSIA						
		Pulmões	Baço	Rins	Fígado	Coração	Linfonodos	TOTAL
Controle	Linfonodos superficiais							
01	3						1	4
02	1						1	2
03	1						1	2
04	1						1	2
05	2	1						3
06	1							1
07	1							1
08	1						1	2
09	2	1					1	4
								21
ANIMAIS SEM LESÕES								0 (0%)
Fusão	Linfonodos superficiais	Pulmões	Baço	Rins	Fígado	Coração	Linfonodos	TOTAL
10								
11							1	1
12		1						1
13	1							1
14		1						1
15	1							1
16	1							1
17								
18								
REDUÇÃO LESÕES								6
ANIMAIS SEM LESÕES								71,42%
ANIMAIS SEM LESÕES								3/9 (33.3%)
rPLD +rCP40	Linfonodos superficiais	Pulmões	Baço	Rins	Fígado	Coração	Linfonodos	TOTAL
19								
20	1							1
21								
22								
23							1	1
24								
25								
26								
27								
REDUÇÃO LESÕES								2
ANIMAIS SEM LESÕES								90,4%
ANIMAIS SEM LESÕES								7/9 (77,7%)

Como a análise dos animais em necropsia foi realizada em abatedouro, tivemos a oportunidade de fazer a pesagem das carcaças após o abate dos animais. Apesar da média de peso de carcaça dos animais do grupo controle ser menor do que dos grupos proteína de fusão e proteínas associadas, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas quando os grupos foram comparados, a $p < 0,05$ (**Figura 8**).

Figura 8. Média de peso das carcaças dos animais dos grupos experimentais. Os resultados de cada grupo em cada tempo foram comparados pelo teste de *one way* Anova e de Tukey, com $p < 0,05$. Não foram encontradas diferenças significativas.



6.4 Avaliação histopatológica do material coletado de necropsia

Nas amostras coletadas dos pulmões dos dois animais do grupo controle que apresentaram lesões, foram observadas extensas áreas nodulares caracterizadas por granulomas imunogênicos com centros de necrose liquefativa por heterólise envoltas predominantemente por intensos infiltrados inflamatórios mononucleares (macrofágico e linfoplasmocitário), delimitados por espessa cápsula conjuntiva. O parênquima adjacente apresentava discreto espessamento conjuntivo peribronquilar, com discreta hiperplasia do BALT (bronchus-associated lymphoid tissue) (**Figura 9**).

Com as outras duas amostras coletadas de outros dois animais do G2, foram encontradas lesões distribuídas em pequenos focos na pleura visceral, caracterizada por mineralização envolta por moderados infiltrados inflamatórios mistos, predominantemente macrófágicos e com presença de células gigantes multinucleadas (**Figura 10**).

Figura 9: Análise de secções histológicas de lesões granulomatosas de pulmão de animais do grupo controle. Obliteração de parte do parênquima por extenso granuloma (**A**) circunscrito por espessa cápsula fibrosa (**B**), intenso infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (**C**) e região central com extensa necrose liquefativa por heterólise (**D**) (C, D – destaque). HE.

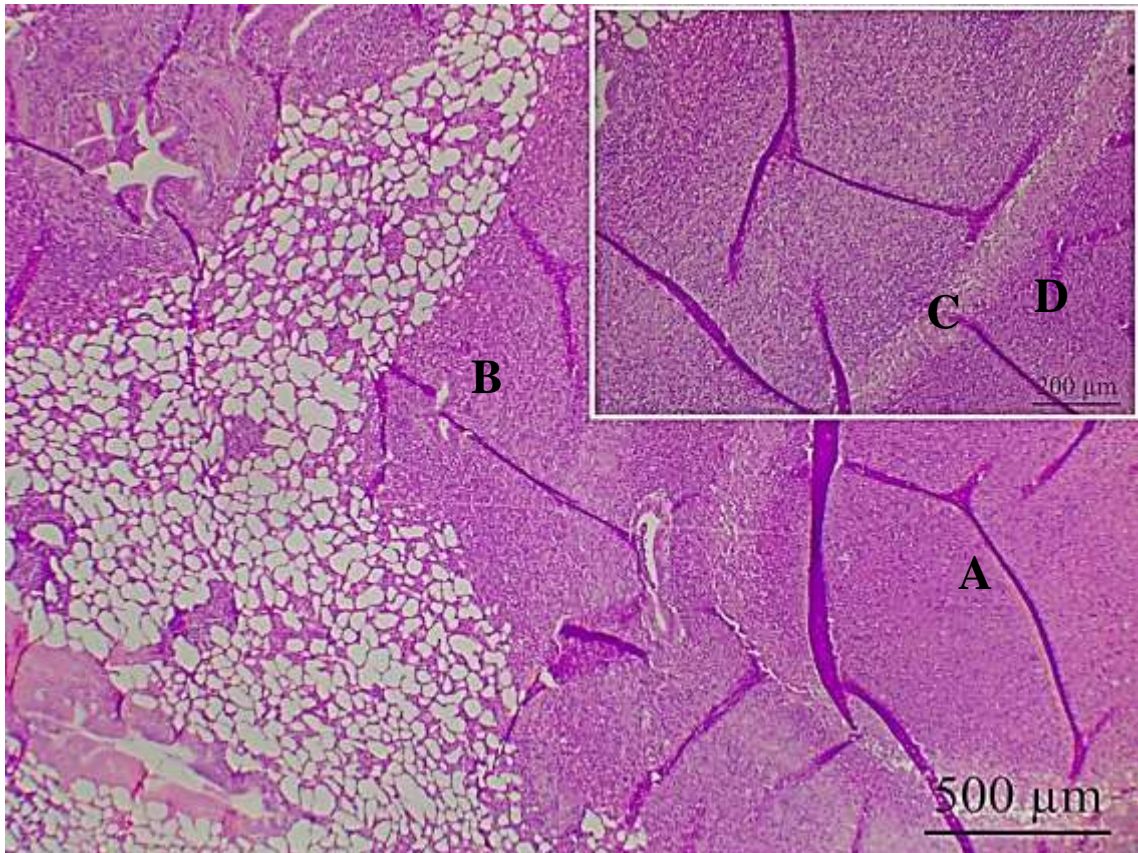
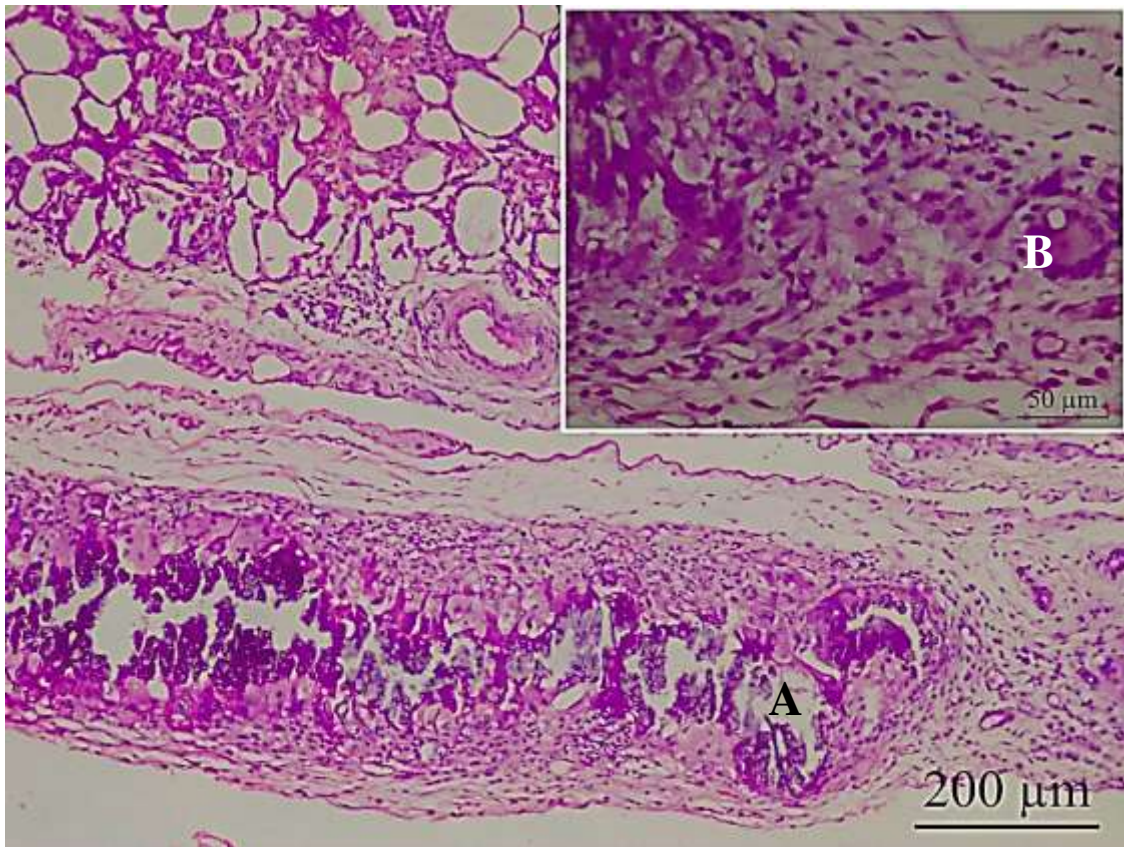


Figura 10: Análises de secções histológicas de pulmão de animais do grupo proteína de fusão. Pleura visceral com mineralização (A) circundada por infiltrado celular predominantemente macrofágico, com células gigantes multinucleadas (destaque) (B). HE.

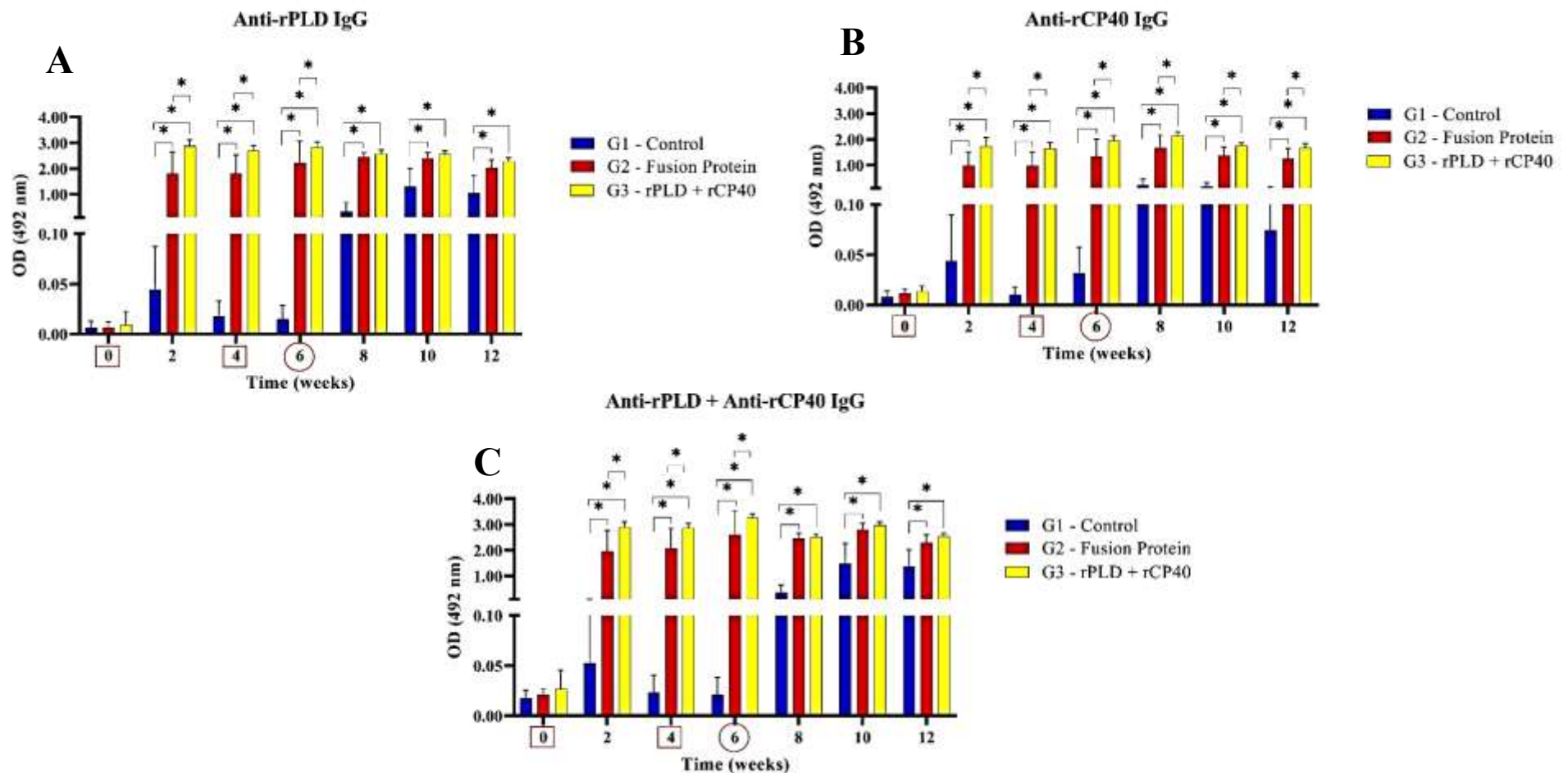


6.5 Resposta Imune Humoral

Na sorologia anti-rPLD, observou-se entre os três grupos uma diferença estatística nas ODs até o desafio, quando então não se configurou mais a mesma entre os grupos testados, somente entre eles e o grupo controle, sendo visível uma ampliação de reatividade neste após o desafio. O grupo imunizado com as proteínas associadas produziu após as duas imunizações mais anticorpos anti-PLD do que os outros dois grupos experimentais, mas não depois do desafio (**Figura 11A**). Uma cinética parecida foi observada quando as placas de ELISA foram sensibilizadas com as duas proteínas em conjunto (**Figura 11C**).

Quando considerada a produção de anticorpos anti-rCP40, foi observada diferença estatística entre as ODs de todos os grupos experimentais ao longo de todo o período experimental, depois das imunizações e também depois do desafio. O grupo imunizado com as proteínas associadas teve produção de anticorpos anti-rCP40 significativamente maior do que os dois outros grupos durante todo o período, e o grupo da proteína de fusão apresentou maior produção de anticorpos do que o grupo controle também durante todo o período experimental, com exceção do dia 0 (**Figura 11B**).

Figura 11: Sorologia dos grupos em relação a produção de anticorpos anti-rPLD (A), anti-rCP40 (B), e anti-rCP40 e PLD (C). São representados no gráfico as médias das ODs de cada grupo com cores distintas, grupo controle em azul, grupo da proteína de fusão em vermelho e grupo da associação de proteínas em amarelo. A existência de diferença estatística é representada com *, e a semanas das imunizações são marcadas com quadrado, e do desafio com um círculo. Os resultados de cada grupo em cada tempo foram comparados pelos testes de *one way* Anova e de Tukey para multicomparações, com $p < 0,05$.

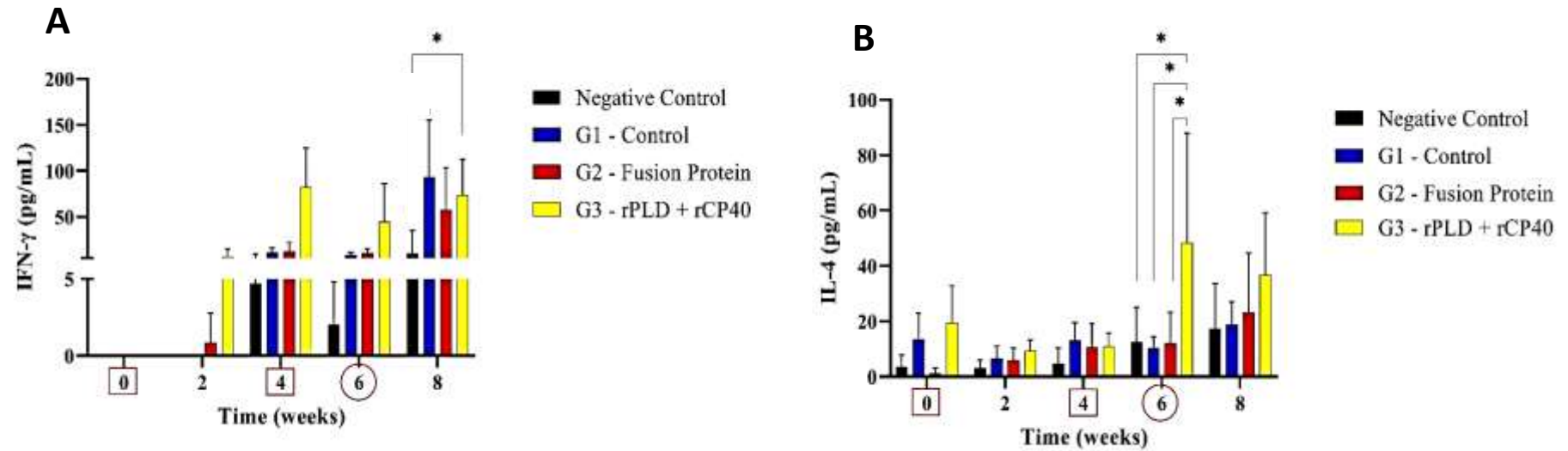


6.6 Avaliação da produção de IFN- γ e IL-4 específicos

Na avaliação da produção de IFN- γ , pode se observar que só houve diferença estatística entre o grupo imunizado com as proteínas individualizadas e o controle, no período pós-desafio (**Figura 12A**). Não foram observadas outras diferenças estatísticas, principalmente com relação ao controle, durante o período experimental. A produção de interferon foi muito variável entre os diferentes animais de cada grupo em cada momento analisado, o que pode ser observado pelo desvio padrão de cada tempo analisado.

Em relação à produção de IL-4, houve uma diferença estatística na produção específica dessa citocina no momento logo após a segunda imunização, entre o grupo vacinado com as proteínas individualizadas e os outros 2 grupos. (**Figura 12B**).

Figura 10: Produção de citocinas IFN- γ (10A) e IL-4 (10B) dos grupos experimentais e média dos controles negativos de produção. São representados no gráfico as médias das ODs de cada grupo com cores distintas, grupo controle em azul, grupo da proteína de fusão em vermelho, grupo da associação de proteínas em amarelo e do controle negativo em preto. A existência de variação estatística representada com * e a semanas das imunizações são marcadas com quadrado e do desafio com um círculo. Os resultados de cada grupo em cada tempo foram comparados pelos testes de *one way* Anova e de Tukey para multicomparações, com $p < 0,05$.



7.0 Discussão

A vacinologia reversa permite, através de ferramentas de bioinformática, elucidar informações imunológicas importantes, as quais eram mais difíceis de serem obtidas no processo convencional, facilitando assim o desenvolvimento de uma vacina (RAPPUOLI, 2001). Devido ao alto custo das pesquisas em imunologia, a utilização de *softwares* de imunobioinformática na pesquisa por novos alvos vacinais tem aumentado nos últimos anos, e esses dados podem ser analisados com alta precisão e velocidade usando estas ferramentas de bioinformática (OLI et al., 2020). A perspectiva de utilização de proteínas de fusão já se faz presente em conceito vacinal para outras patologias de ovinos, tais como parasitoses (DEMPSTER et al., 1996) ou viroses (GARG et al., 2016), sendo que existem trabalhos relatando o uso desta técnica para diferentes fins biológicos (TERPE, 2003; CHEN et al., 2013).

Também o estudo para a formulação de adjuvantes vacinais tem se desenvolvido muito ao longo dos anos, pois a estimulação de compartimentos específicos do sistema imune é de fundamental importância nesse processo (BRITO et al., 2013). Visando este propósito, a biologia sintética permite a fusão de moléculas ao material proteico imunogênico proposto com essa finalidade, como é o caso da *Maltose Binding Protein* (MBP), a qual já vem sendo descrita na literatura como uma proteína que tem ação de adjuvante intrínseca em modelos vacinais com proteínas de fusão, mostrando uma ativação do sistema imune através da ligação com os receptores Toll-Like (TLRs) 2 e 4 (NI et al., 2014; GONG et al., 2015; LIU et al., 2017). A inclusão da MBP ao binômio proteico da *C. pseudotuberculosis* usado em um dos imunógenos testado neste estudo foi idealizada em função sua afinidade com os receptores TLRs 2 e 4, encontrados nas células apresentadoras de antígeno, e a MBP atuaria como um adjuvante intrínseco ao complexo proteico vacinal ativando o sistema imune inato, facilitando assim sua apresentação aos linfócitos T auxiliares.

Após as imunizações, os animais se apresentaram com alterações clínicas compatíveis com a doença diante das avaliações realizadas, estando a aferição da temperatura retal dos animais dos grupos dentro da normalidade, de acordo com a literatura clínica clássica de clínica de ruminantes (KANEKO et al., 2008). Não foram notadas alterações que traduzissem patologias maiores no período de observação, o que traduz a ausência de efeitos colaterais vacinais induzida pelas formulações vacinais aqui testadas.

Os granulomas superficiais desenvolvidos nos animais durante o estudo e que foram endereçados para a análise microbiológica e molecular se apresentaram como descrito por Batey (1986). Estavam localizados em linfonodos próximos ao local da inoculação do desafio.

Lima et al (2017) relataram que 94,73% dos ovinos da sua pesquisa apresentaram também lesões próximas ao local de inoculação do desafio, o que confirma, como no presente estudo, o deslocamento do agente para linfonodos adjacentes.

A redução no número casos de granulomas superficiais nos animais inoculados com a associação das proteínas em relação ao grupo controle representa significativamente uma atividade imunoprotetora das proteínas rPLD e rCP40, quando administradas associadas. Essa redução pôde ser recalculada para 90,4% quando forem levados em consideração os linfonodos granulomatosos e outras lesões encontrados nas carcaças na necropsia. Já os animais inoculados com a proteína de fusão tiveram uma redução de lesões de 71,42%. Esta mesma metodologia de cálculo foi usada por Walker et al (1994), que imunizaram cordeiros somente com a proteína CP40 e obtiveram uma redução de lesões de aproximadamente 55% em relação ao grupo controle, o que chegou a 60% quando foi utilizada uma dose maior. É interessante notar que os animais do grupo vacinado com a proteína de fusão neste estudo apresentaram ainda lesões nos pulmões, o que não foi visto nos animais vacinados com a associação rPLD e rCP40, e este fato pode estar associado com a ativação da resposta imune contra a toxina PLD, restringindo a disseminação da bactéria para pontos mais distantes do local de inoculação, já que a PLD age justamente neste aspecto da patogenia da doença (MCKEAN et al., 2007), função a qual estaria prejudicada quando da neutralização dessa toxina por anticorpos. É muito provável que as proteínas associadas e não fusionadas foram mais bem reconhecidas pelo sistema imune do animal, os quais puderam desenvolver uma resposta imune mais inclusiva e ampla para diferentes epítomos.

A necropsia reforçou a boa percepção *ante-mortem* dos resultados nos animais vacinados com as proteínas associadas, pois avaliando as lesões internas não foi possível observar lesões pulmonares (e em nenhum outro órgão) em nenhum animal neste grupo, sendo encontradas lesões desse tipo em dois animais vacinados com a proteína de fusão, e em dois do grupo controle. Fontaine et al (2006) encontraram lesões pulmonares em sete dos oito ovinos desafiados em seu estudo, sendo o período de observação pós desafio igualmente de nove semanas, como no presente trabalho. Prescott et al (2002), após eutanasiarem uma ovelha 454 dias após desafio, encontraram seis abscessos do tamanho de uma ervilha nos pulmões deste animal. Dessa forma, verifica-se que o desafio com *C. pseudotuberculosis* patogênica pode induzir comumente lesões pulmonares, e que o fato de que nenhum animal do grupo imunizado com as proteínas associadas é resultado de suma importância, pois pode refletir uma limitação do *spread* bacteriano.

Mesmo não havendo diferenças estatísticas, é importante notar que houve uma diferença de aproximadamente dois quilogramas a mais na média do peso das carcaças dos animais imunizados com as proteínas associadas em relação ao grupo controle, o que pode ser consequência da retirada de aparas sanitárias, pois o Serviço de Inspeção Federal em sua normativa preconiza o descarte completo ou parcial das carcaças que apresentarem lesões relacionadas à linfadenite caseosa (BRASIL, 2017). Este fato foi igualmente relatado por Arsenault et al (2003) em seu estudo canadense, e posteriormente comentado por Patton et al (2003) quando avaliaram o prejuízo causado pela linfadenite caseosa na ovinocultura. No presente estudo, esse prejuízo relacionado ao grupo controle representaria aproximadamente US\$ 70,00, de acordo com as expectativas de pagamento confeccionadas pelo abatedouro, e baseando-se em nove animais do grupo controle e nove animais do grupo imunizado com as proteínas associadas. Como a linfadenite caseosa é uma doença de caráter crônico, caracterizada mais pela morbidade do que pela mortalidade, é esperado que com o tempo, caso os animais não fossem abatidos, mais lesões aparecessem, principalmente no grupo controle, e os danos ao couro dos animais (linfonodos superficiais), e as lesões internas (que podem dificultar a alimentação do animal e interferir em processos fisiológicos normais) poderiam induzir uma redução ainda maior de ganho de peso desses animais, acarretando maiores diferenças.

Diferentemente do que poderia ser esperado em termos de imunoativação, a análise histopatológica das lesões granulomatosas pulmonares dos animais do grupo controle apresentaram uma maior reatividade imunológica, quando comparadas com as lesões desenvolvidas pelos animais imunizados com as proteínas fusionadas. Isso se traduz pelo intenso infiltrado linfoplasmocitário encontrado no grupo controle, enquanto o grupo vacinado apresentou apenas um infiltrado macrofágico, com algumas células gigantes, e menor reatividade de BALT. O que se figura na comparação é que as lesões encontradas no grupo controle se aparentam mais a lesões mais recentes, ainda ativas e em formação, enquanto a do G2 se apresentam como mais maduras e reguladas, já com formação de mineralização. O quadro apresentado na análise dos animais do grupo controle condiz com o descrito por Singh et al (2017) em um estudo de caso em um caprino com o mesmo agente patogênico. Também em um experimento comparativo em caprinos com a *C. pseudotuberculosis*, Mahmood et al (2015), observaram que houve uma grande infiltração de células inflamatórias pulmonares nos animais desafiados, nenhuma no grupo controle não desafiado e pequena nos animais que somente receberam PLD sem serem desafiados. Uma característica clássica do desenvolvimento da linfadenite caseosa é a indução de uma hipersensibilidade do tipo IV, com intensa reatividade celular, quimiotaxia, e formação de granulomas (BARRAL et al, 2022b). Um dos processos

limitantes para a formação desses granulomas seria uma reatividade imunológica especificamente dirigida à bactéria, com diminuição da carga bacteriana que causa o estímulo antigênico, em associação com uma resposta imunológica também regulatória, a qual impediria o excesso de resposta celular visto na formação granulomatosa (BARRAL et al., 2022c). A ausência de lesões no grupo vacinado com as proteínas associadas, e o encontro de lesões menores e mais maduras nos animais vacinados com a proteína de fusão, podem indicar então uma resposta imune limitadora da multiplicação bacteriana, bem como uma resposta dirigida não somente ativadora, mas também regulatória. Os dados neste experimento mostram que imunização prévia dos animais antecipa de forma preparatória a atividade defensiva modulando a resposta inflamatória pós desafio, de modo a evitar uma resposta exacerbada e ineficaz e inibindo o desenvolvimento de lesões com maiores dimensões, como pode ser constatado no grupo G3 do presente estudo, no qual além da rPLD foi utilizada também a rCP40 como imunógenos.

A análise das respostas imune celular e humoral desenvolvidas pelos animais imunizados com ambas as formulações vacinais confirmam os aspectos acima discutidos sobre a relação da resposta imune induzida com a diminuição do número de lesões, e também a formação de lesões menores e mais maduras nos animais imunizados. As sorologias anti-rPLD, anti-rCP40 e anti-rPLD e rCP40 demonstraram que, como era naturalmente esperado, o nível de anticorpos dos animais imunizados eleva-se substancialmente após a primeira imunização, mantém-se elevadas após a segunda imunização, e também se mantem significativamente maiores após o desafio. De forma interessante, os animais vacinados com as proteínas associadas apresentaram níveis de anticorpos anti-rCP40 maiores até mesmo do que os animais imunizados com a proteína de fusão, o que se manteve após o desafio. Como anteriormente elocubrado, os anticorpos anti-PLD agem basicamente inativando esta toxina, o que podem então limitar o spread bacteriano no hospedeiro, levando em consideração o fato de que a PLD age justamente criando um ambiente favorável à mobilização da bactéria no organismo do hospedeiro (MAHMOOD et al., 2015). Já com relação à CP40, esta teve sua atividade reclassificada, pois antigamente acreditava-se que tinha uma função de proteína quinase, e foi visto por Shadnezhad et al (2016) que a mesma contém um motivo hidrolase de glicosídeo, hidrolisa glicanos biantenários em imunoglobulinas humanas e ovinas; a sua neutralização por anticorpos então resultaria numa menor atividade inibitória da resposta humoral.

As proteínas aqui utilizadas já haviam sido testadas isoladamente em outros trabalhos, sendo a PLD testada há mais tempo e mais amplamente (HODGSON et al., 1994; 1999; SELIM et al., 2010; 2016), propiciando nestes estudos uma proteção parcial, e uma maior indução de

resposta imune humoral. Quanto à CP40, mais recentemente testada, também acarretou uma proteção parcial, mas com indução de resposta imune celular (DROPPA-ALMEIDA et al., 2016). Silva et al (2014) observaram, analisando a produção de IgG1 em camundongos imunizados com a CP40, um aumento significativo desta imunoglobulina após o décimo quinto dia posterior a imunização. O fato de que a proteína de fusão foi menos efetiva do que as proteínas simplesmente associadas na indução de resposta imune humoral, principalmente anti-rCP40, pode estar relacionada com a disposição espacial das duas proteínas quando fusionadas e a disponibilidade dos epítomos de cada uma quando fusionadas ou associadas, sendo que a fusão pode ter deixado algumas regiões com epítomos não tão acessíveis quanto ocorre quando as proteínas não estão fusionadas.

Como no presente trabalho, a imunização com as duas proteínas fusionadas ou associadas só se fez até o momento no estudo de Barral et al (2022a), quando foram testadas em modelo murino, e onde se obteve um maior efeito imunoprotetor com a proteína de fusão, o inverso do que ocorreu quando agora testadas em ovinos. É importante ressaltar, contudo, que as concentrações dos imunógenos inoculados e o adjuvante usado no experimento com murinos foram diferentes, sendo utilizado o adjuvante saponina nos camundongos. O adjuvante proposto neste experimento já fora usado em experimentos vacinais em ruminantes e com outros patógenos, com comprovada eficácia na estimulação de células Th1, e desta forma atingindo não só uma maior resposta celular, mas subsequentemente também defesa humoral baseada em anticorpos opsonizantes (KHORASANI et al., 2016; ZHU et al., 2020). Quanto às concentrações de PLD, foram estipuladas concentrações baseadas em estudos anteriores (SELIM et al., 2016; MOUSSA et al., 2016). Já em relação à CP40, um único estudo em ovinos realizado por Walker et al (1994) preconiza a administração de 5 µg; porém no presente trabalho optou-se por igualar as concentrações de ambas as proteínas para obter um melhor efeito comparativo.

Na análise de produção de citocinas após estímulo específico em cultivo celular, pode-se notar que a imunização com as proteínas associadas possibilitou um aumento significativo na produção de interferon-gama após o desafio, de modo semelhante aos observados no trabalho realizado em caprinos por Moura-Costa et al (2008) utilizando uma vacina atenuada, não sendo essa produção significativa antes do desafio nem para o grupo de proteínas associadas e nem para o de proteína de fusão. Em um estudo utilizando a mesma metodologia de dosagem, houve aumento significativo na produção de IFN- γ após desafio experimental, sendo o maior deles posterior a uma terceira dose, que ocorreu 300 dias depois da primeira (PRESCOTT et al, 2002). Em murinos, Vale et al (2016) obtiveram resultados de aumento nos níveis de IFN- γ no

sobrenadante de cultivo 60 dias após o desafio. O IFN- γ é uma citocina específica da resposta imune celular do tipo Th1, sendo produzida principalmente pelos linfócitos auxiliares estimulados pela apresentação com antígenos; esta citocina tem uma função primordial na imunidade, sendo capaz de estimular a ativação de outros linfócitos auxiliares e mesmo de citotóxicos, e aumenta a capacidade fagocítica de macrófagos, sendo então essencial para a resposta a microrganismos intracelulares (GHANAVI et al, 2021). Então, a capacidade induzida pela vacinação com as proteínas associadas de ativação da imunidade celular mediada por interferon-gama pode ter sido essencial para a diminuição significativa do número de lesões associadas com o desafio.

Algo que também se percebe com a mensuração da produção de interferon-gama é a grande variabilidade das respostas, onde animais de um mesmo grupo e imunizados com uma mesma formulação vacinal tiveram respostas bem díspares, aumentando dessa forma os desvios padrões encontrados. Esse fato, em uma visão inicial, pode ser contabilizado em uma possível falha na dosagem da citocina ou do estímulo *in vitro*, mas achados anteriores de nosso grupo de pesquisa fundamentam esse resultado. Rebouças et al (2011), ao tentar utilizar a dosagem específica de interferon-gama após estímulo *in vitro* como metodologia de diagnóstico de infecção pela bactéria, observaram que as produções desta citocina em animais naturalmente infectados com *C. pseudotuberculosis* é extremamente variável, o que inviabiliza a adoção de tal técnica como opção diagnóstica, e que justifica os resultados por nós encontrados.

O aumento significativo da produção de IL-4 foi notado somente no grupo imunizado com as proteínas associadas, logo depois da segunda imunização. Em murinos, Ribeiro et al (2014) observaram o aumento de IL-4 em cultivo de esplenócitos de animais imunizados com uma dose de reforço de uma vacina baseada em um mutante atenuado de *C. pseudotuberculosis* antes do desafio, de modo semelhante ao trabalho de Rezende et al (2020) também com murinos e utilizando proteína recombinante como imunógeno, como ocorrido neste estudo. Pinho et al (2009), mesmo uma semana após a terceira dose de um imunizante contendo proteína recombinante, e 45 dias após a primeira, não observaram este aumento nesta citocina, o mesmo ocorrendo no trabalho de Barral et al (2022a).

A produção e liberação da IL-4 regula a especialização das células T virgens em células Th2 (RAZALI et al, 2020). É uma citocina envolvida com aspectos mais inerentes a respostas crônicas do que agudas, sendo fundamental para uma posterior regulação da resposta induzida por interferon-gama, pois regula especificamente a produção desta citocina, e induz fatores que são ligados à remodelação tecidual e ativação alternativa de macrófagos (JUNTILLA, 2018). Essa função da IL-4 pode estar associada diretamente ao nosso resultado encontrado nos

granulomas pulmonares de animais vacinados, com a apresentação de uma lesão mais madura e regulada, exibindo então a importância dessa citocina durante a resposta imune contra a bactéria.

8.0 Conclusão

Este estudo demonstrou a viabilidade imunogênica de uma vacina composta da associação das proteínas rPLD e rCP40, através de seus resultados clínicos, sorológicos e de produção de citocinas, os quais se apresentaram satisfatórios, bem como de redução do número de lesões e de animais enfermos. Quanto à proposta de vacina contendo como imunógeno a proteína de fusão MBP:PLD:CP40, apesar dos resultados clínicos, sorológicos e de produção de citocinas terem se apresentado positivos, se fazem necessários novos testes para averiguação quanto a possíveis fatores limitantes destes resultados, como a concentração da proteína na dose, desenho de uma proteína de fusão contendo um linker maior que possibilite a exposição maior dos epítomos, ou mais doses no esquema vacinal, por exemplo.

9.0 Considerações finais

É inegável o prejuízo na caprino e ovinocultura causado pela linfadenite caseosa em todo o mundo, e desta forma a busca por uma profilaxia vacinal eficiente se faz necessária. Como para outras patologias, a biotecnologia tem sido um instrumento de extremo valor nesta busca, pois específica objetivos e reduz tempo de processos, justificando com isso a ampliação dos estudos para obtenção de resultados verdadeiramente viáveis, e de forma célere.

O presente estudo demonstra duas formulações vacinais, as quais não induziram efeitos colaterais, tiveram efeito de indução da ativação das repostas imunes celular e humoral, e induziram efeito imunoprotetor caracterizado pela redução do número de lesões e de animais enfermos. Assim, espera-se que um curto prazo possamos realizar estudos mais inclusivos, com um maior número de animais, para confirmar esse potencial imunogênico e imunoprotetor, bem como a ausência de efeitos colaterais, visando então a colaboração com empresa para posterior desenvolvimento de produto comercial a ser utilizado na caprino e ovinocultura.

10.0 Referências bibliográficas

ABDULLAH, F.F.J; ABBA, Y.; NURUL, S. R.; ADAMU, L.; BITRUS, A. A.; CHUNG, E. L. T.; SADIQ, M. A.; HAMBALI, I. U.; HARON, W.; LILA, M. A. M. Clinical case of caseous lymphadenitis in a goat: Case management. **Malaysian Journal of Veterinary Research**, n, 1, p. 31–35, 2017. doi: 10.5455/ijlr.20150221071744

ABU-BOBIE, J.; CAPECCHI, B.; SERRUTO, D.; RAPPUOLI, R.; PIZZA, M. Two years into reverse vaccinology. **Vaccine**, v. 21, p. 605-610, 2003.

ALENCAR, S. P.; MOTA, R. A.; COELHO, M. C. O. C.; NASCIMENTO, S. A.; ABREU, S. R. de O.; CASTRO, R. S. Perfil sanitário dos rebanhos caprinos e ovinos no sertão de Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.1, p.131-140, 2010. doi: 10.5216/cab.v11i1.4051

ALIJAMEEL, M. A.; MOHAMMED, G. E.; BAKHIET, A. O. Tuberculosis in Sheep and Goats: pathological characteristics based on abattoir Study in South Darfur State, Sudan. **Sudan Journal of Science and Technology**. V. 18, p. 107-126, 2017.

ALMEIDA, A. C. de; TEIXEIRA, L. M.; DUARTE, E. R.; MORAIS, G. de; SILVA, B. C. da M. e; GERASEEV, L. de C. Perfil sanitário dos rebanhos caprinos e ovinos no Norte de Minas Gerais. **Comunicata Scientiae**, v. 1, p. 161-166, 2010.

ALVES, J. R. A.; FARIAS, A. E. M. de; ANJOS, D. M. dos; LIMA, A. M. C.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; SOUZA, C. J. H. de; PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F.; AZEVEDO, S. S; ALVES, C. J. Seroepidemiological study of Caseous lymphadenitis in sheep from the Northeast region of Brazil using an indirect ELISA. **Tropical Animal Health and Production**, 2019. doi: 10.1007/s11250-020-02214-9

ALVES, F. S. F.; SANTIAGO, L. B.; PINHEIRO, R. R. Linfadenite Caseosa: o Estado da Arte. **Documentos**, Sobral, EMBRAPA caprinos, v.74, p. 38-39, 2007.4

AMET, N; WANG, W.; SHEN, W-C. Human growth hormone–transferrin fusion protein for oral delivery in hypophysectomized rats. **Journal of Controlled Release**, v. 141, p. 177-182, 2010. doi: 10.1016/j.jconrel.2009.09.007

ARSENAULT, J.; GIRARD, C.; DUBREUIL, P.; DAIGNAULT, D.; GALARNEAU, J-R.; BOISCLAIR, J.; SIMARD, C.; BÉLANGER, D. Prevalence of and carcass condemnation from Maedi–Visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. **Preventive Veterinary Medicine**. v.59, p. 67-81, 2003. doi: 0.1016/S0167-5877(03)00060-6

AUAD, J.; CERUTTI, J.; COOPER, L. G.; CAMUSSONE, C. M.; LOZANO, N. A.; CRESPO, F. M.; LOZANO, A. Humoral immune response of pregnant goats to two *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterin formulations. **Austral Journal of Veterinary Sciences**, v.50, p.101-105, 2018.

AURORA, R.; CREAMER, T. P.; SRINIVASAN, R.; ROSE, G.D. Local interactions in protein folding: lessons from the alpha-helix. **Journal of Biological Chemistry**. p.1413-1416, 1996. doi: 10.1074/jbc.272.3.1413

BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n. 4, p. 179–210, 2007. doi: 10.1016/j.jcpa.2007.07.002

BAIRD, G. J. Caseous lymphadenitis *In*: OBE, I. D. A. **Diseases of sheep**, Singapura: Blackwell, cap. 9, p. 306-311, 2007.

BAIRD, G. Treatment of ovine caseous lymphadenitis. **Veterinary Record**, v. 159, n. 15, p. 500, 2006. doi: 10.1136/vr.159.15.500

BALIN, A. K.; PRATT, L. Dilute povidone-iodine solutions inhibit human skin fibroblast growth. **Dermatologic Surgery**, v. 28, n. 3, p. 210–214, 2002. doi: 10.1046/j.1524-4725.2002.01161.x

BARRAL, D. T.; KALIL, M. A.; MARIUTTI, R. B.; ARNI, R. K.; GISMENE, C.; SOUSA, F. S.; COLLARES, T.; SEIXAS, F. K.; BORSUK, S.; ESTRELA-LIMA, A.; AZEVEDO, V.; MEYER, R.; PORTELA, R.W. Immunoprophylactic properties of the *Corynebacterium pseudotuberculosis*-derived MBP:PLD:CP40 fusion protein. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 2022a. doi: 10.1007/s00253-022-12279-1

BARRAL, D. T.; PORTELA, R. W.; SEYFFERT, N.; MOORE, R. *Corynebacterium*, *Arcanobacterium*, and *Trueperella* *in*: PRESCOTT, J. F.; RYCROFT, A. N.; BOYCE, J. D.; MACLNNES, J. I.; IMMERSEEL, F. V.; VÁZQUEZ- BOLAND, J. A. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. Wiley Online Library, 2022b, cap. 32, p. 2. doi: 10.1002/9781119754862;

BARRAL, D. T.; REBOUÇAS, M. F.; LOUREIRO, D.; RAYNAL, J. T.; SOUSA, T. J.; MOURA-COSTA, L. F.; AZEVEDO, V.; MEYER, R.; PORTELA, R. W. Chemokine production induced by *Corynebacterium pseudotuberculosis* in a murine model. **Brazilian Journal of Microbiology**. 2022c. doi: 10.1007/s42770-022-00694-5

BARRAL, D. T.; MARIUTTI, R. B.; ARNI, R. K.; SANTOS, A. J.; LOUREIRO, D. SOKOLONSKI, A. R.; AZEVEDO, V.; BORSUK, S.; MEYER, R.; PORTELA, R. D. A panel

of recombinant proteins for the serodiagnosis of caseous lymphadenitis in goats and sheep. **Microbial Biotechnology**. 2019. doi: 10.1111/1751-7915.13454.

BASTOS, B. L.; MEYER, R.; GUIMARÃES, J. E.; AYRES, M. C.; GUEDES, M. T.; MOURA-COSTA, L. F.; BURGHGRAVE, U. S. de; SENA, L.; AZEVEDO, V.; PORTELA, R. W. Haptoglobin and fibrinogen concentrations and leukocyte counts in the clinical investigation of caseous lymphadenitis in sheep. **Veterinary Clinical Pathology** v. 40, p. 496-503, 2011. doi: 10.1111/j.1939-165X.2011. 00355.x

BATEY, R.G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, n. 9, 1986

BLOOD, D.C.; HENDERSON, J.A. Doenças causadas por bactérias-I. *In*: BLOOD, D.C.; HENDERSON, J.A. **Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978. 4ª ed. cap. 15, p.265-266.

BRASIL. Ministério da Agropecuária e Abastecimento. **Decreto Nº 9.013, de 29 de março de 2017**. Brasília, 2017. Seção IV, Art. 225.

BRITO, L. A.; MALAYA, P.; O'HAGAN, D. T. Vaccine adjuvant formulations: A pharmaceutical perspective. **Seminars in Immunology**. 2013. doi: 10.1016/j.smim.2013.05.007

BROGDEN, K. A.; CUTLIP, R.C.; LEHMKUHL, H. D. Effect of muramyl dipeptide on immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole-cell vaccines in mice and lambs. **American Journal of Veterinary Research**, v.1, n.2, p.200-202, 1990.

BROGDEN, K. A.; GLENN, J. S.; EAST, N.; AUDIBERT, F. A *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterin with muramyl dipeptide induces antibody titers, increases the time of onset, and decreases naturally occurring external abscesses in sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v.19, p.161-168, 1996

BRUM, A. A.; RESENDE, A. de F. S.; BRILHANTE, F. S.; COLLARES, T.; BEGNINE, K.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T. V.; DELLAGOSTIN, O. A.; AZEVEDO, V.; SANTOS, A.; PORTELA R. W.; BORSUK, S. Recombinant esterase from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit recombinant vaccines partially protects mice against challenge. **Journal of Medical Microbiology**. v. 66, p. 635-642, 2017. doi: 10.1099/jmm.0.000477

CAMERON, C. M.; ENGELBRECHT, M. M. Mechanism of immunity to *Corynebacterium pseudotuberculosis* (BUCHANAN, 1911) in mice using inactivated vaccine. **Onderstepoort Veterinary Research**, v.38, n.2. p.73-82, 1971.

CARNE, H. R.; ONON, E. O. Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels. **Nature**, v.271, p.246-248, 1978.

CASTILHOS, L. R. de; PINTO, L. F.; ALMEIDA, B. M. de. Possibilidade Terapêutica na Linfadenite Caseosa em Caprinos no Sistema Orgânico de Produção. **Brazilian Homeopathic Journal**. v. 8, p. 19-22, 2002.

CEBRA, C.; CEBRA, M. Distúrbios hematopoiéticos e hemolinfáticos. *In*: OGILVIE, T. H. **Medicina Interna de Grandes Animais**. Porto Alegre: Artimed, cap. 14, p. 359-360, 2000.

ÇETINKAYA, B.; KARAHAN, M.; ATIL, E.; KALIN, R.; de BAERE, T.; VENECHOUTTE, M. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. **Veterinary Microbiology**. 2002, v.88 p.75–83. doi: 10.1016/S0378-1135(02)00089-5

CHAPLIN, P. J.; ROSE, R.de; BOYLE, J. S.; MCWATERS, P.; KELLY, J.; TENNENT, J. M.; LEW, A. M.; SCHEERLINK, J-P. Y. Targeting Improves the Efficacy of a DNA Vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Sheep. **Infection and Immunity**. v. 64, n. 12, p. 6434-6438, 1999

CHIEBAO, D. P.; ROMALDINI, A. H. de C. N. Linfadenite caseosa de ovinos. *In*: **Boletim Técnico Sanidade na Ovinocultura II**. São Paulo: Instituto Biológico, n.28, p.35, 2017.

CHIEN, X.; ZARO, J. L.; SHEN, W-C. Fusion protein linkers: Property, design and functionality. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.65, p.1357-1369, 2013. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.039

CHIRINO-ZAGARRA, C.; SCARAMELLI, A.; REY-VALERÍO, C. Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. **Small Ruminant Research** 2006 v. 65, p. 170–175. doi: 10.1016/j.smallrumres.2005.06.017

COVIÁN, C.; FERNÁNDEZ-FIERRO, A.; RETAMAL-DÍAZ, A.; DÍAZ, F. E.; VASQUEZ, A. E.; LAY, M. K.; RIEDEL, C. A.; GONZALÉZ, P. A.; BUENO, S. M.; KALERGIS, A. M. BCG-Induced cross-protection and development of trained immunity: Implication for vaccine design. **Frontiers in Immunology**, v.10, 2019. doi: 10.3389/fimmu.2019.02806.

DEMPSTER, R. P.; ROBINSON, C. M.; HARRISON, G. B. L. Parasite vaccine development: large-scale recovery of immunogenic *Taenia ovis* fusion protein GST-45W(B/X) from *Escherichia coli* inclusion bodies. **Parasitology Research**. v. 82, p. 291-296, 1996.

DOHERR, M. G.; CARPENTER, T. E.; HANSON, K. M. P.; WILSON, W. D.; GARDNER, I. A. Risk factors associated with *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in California horses. **Preventive Veterinary Medicine**. v.35, p. 229-239, 1998.

DOMENIS, L.; SPEDICATO, R.; PEPE, E.; ORUSA, R.; ROBERTO, S. Caseous Lymphadenitis Caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Alpine Chamois (*Rupicapra r. rupicapra*): a Review of 98 Cases. **Journal of Comparative Pathology**. v.161, p. 11-19, 2018. doi: 10.1016/j.jcpa.2018.04.003

DORELLA, F.A.; PACHECO, L.G.C.; OLIVEIRA, S.C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence, **Veterinary Research**., v. 37, p. 201–218, 2006. doi: 10.1051/vetres:2005056

DROPPA-ALMEIDA, D.; VIVAS, W. L.; SILVA, K. K. O.; REZENDE, A. F. S.; SIMIONATTO, S.; MEYER, R.; LIMA-VERDE, I. B.; DELLAGOSTIN, O. A.; BORSUK, S.; PADILHA, F. F. Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. **Vaccine**, v. 34, n. 8, p. 1091-1096, 2016. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.12.064

DROPPA-ALMEIDA, D.; VIVAS, W. L.; FRAGA, E. R.; REZENDE, A. F. S.; ALVES, L. L.; MEYER, R.; LIMA-VERDE, I. B.; DELLAGOSTIN, O.; BORSUK, S.; PADILHA, F. F. Response with TH1 profile obtained in vaccine formulation against Caseous Lymphadenitis in animal model C57 Black/6. **Biotechnology Research and Innovation**, v.3, p.192-196, 2019. doi: 10.1016/j.biori.2018.11.002

EVANS, R.; O'NEILL, M.; PRITZEL, A.; ANTROPOVA, N.; SENIOR, A.; GREEN, T. Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer. **Biorxiv [Preprint]** 2021. doi: 10.1101/2021.10.04.463034

FACCIOLI-MARTINS, P.Y.; ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. Linfadenite caseosa: perspectivas no diagnóstico, tratamento e controle. **Embrapa Caprinos e Ovinos**, Sobral: 71p, 2014.

FARIAS, A. M.; ALVES, J. R. A.; ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; LIMA, A. M. C.; AZEVEDO, S. S.; ALVES, C. J. Soroprevalência da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos Nordeste brasileiro utilizando técnica de imunoabsorção enzimática (ELISA-indireto). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 1344-1350, 2018. doi: 10.1590/1678-5150-PVB-5282

FARIAS, A. E. M de; ALVES, J. R. A.; ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; LIMA, A. M. C.; AZEVEDO, S. S. de; ALVES, C. J. Seroepidemiological

characterization and risk factors associated with seroconversion to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in goats from Northeastern Brazil. **Tropical Animal Health and Production**. v. 51, p. 745-452, 2019. doi: 10.1007/s11250-018-1748-7

FIRACATIVE, C.; GRESSLER, A. E.; SCHUBERT, K.; SCHULZE, B.; MÜLLER, U.; BROMBACHER, F.; BERGEN, M. von; ALBER, G. Identification of T helper (Th)1-and Th2-associated antigens of *Cryptococcus neoformans* in a murine model of pulmonary infection. **Scientific Reports**. v. 8, p.2861, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-21039-z

FOLEY, J. E.; SPIER, S. J.; MIHALYI, J.; DRAZENOVICH, N.; LEUTENEGGER, C. M. Molecular epidemiologic features of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from horses. **American Journal of Veterinary Research**. v. 65, n. 12, p. 1734- 1737, 2004.

FONTAINE, M. C.; BAIRD, G. J. Caseous Lymphadenitis. **Small Ruminant Research**. v. 76, p.42-48, 2008. doi. 10.1016/j.smallrumres.2007.12.025

FONTAINE, M. C.; BAIRD, G.; CONNOR, K. M.; RUDGE, K.; SALES, J.; DONACHIE, W. Vaccination confers significant protection of sheep Against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine**, v. 24, p. 5986-5996, 2006. doi:10.1016/j.vaccine.2006.05.005

GARG, R.; LATIMER, L.; WANG, Y.; SIMKO, E.; GERDTS, V.; POTTER, A.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. Maternal immunization with respiratory syncytial virus fusion protein formulated with a novel combination adjuvant provides protection from RSV in newborn lambs. **Vaccine**, v. 34, p. 261-269, 2016. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.11.029

GONG, Z.; MATIN-GARCIA, J. M.; DASKALOVA, S. M.; GRACIUNESCU, F. M.; SONG, L.; Dörner, K.; HANSEN, D. T.; YANG, J-H.; LABAER, J.; HOGUE, B. G.; MOR, T. S.; FROMME, P. Biophysical Characterization of a Vaccine Candidate against HIV-1: The Transmembrane and Membrane Proximal Domains of HIV-1 gp41 as a Maltose Binding Protein Fusion. **PLOS ONE**. 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0136507

GHANA VI, J.; FARNIA, P.; FARNIA, P.; VELAYATI, A. A. The Role of Interferon-Gamma and Interferon-Gamma Receptor in Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections. **International Journal of Mycobacteriology**. v. 10, p. 349-357, 2021. doi: 10.4103/ijmy.ijmy_186_21

GUILHERME, R. de F.; FARIAS, D. A. de; ALVES, J. R. A.; COSTA, D. F. da; PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F.; AZEVEDO, S. S. de; ALVES, C. J. Characterization and typology of sheep and goat production systems in the State of Paraíba, a semi-arid region of northeastern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 4, p. 2163-2178, 2017. doi: 10.5433/1679-0359.2017v38n4p2163

GUIMARÃES, A. S.; CARMO, F. B.; HEINEMANN, M. B.; PORTELA, R. W. D.; MEYER, R.; LAGE, A.P.; SEYFFERT, N.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; GOUVEIA, A. M. G. High sero-prevalence of caseous lymphadenitis identified in slaughterhouse samples as a consequence of deficiencies in sheep farm management in the state of Minas Gerais, Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 7, n. 1, p. 68, 2011. doi: 10.1186/1746-6148-7-68

HEGGELUND, L.; GAUSTAD, P.; HÁVELSRUD, O. E.; BLOM, J.; BORGEN, L.; SUNDSET, A.; SORUM, H.; FROLAND, S. S. *Corynebacterium pseudotuberculosis* pneumonia in a veterinary student infected during laboratory work. *Open Forum Infectious Diseases*, v. 2, n. 4, p. 1–8, 2015.

HODGSON, A. L. M.; KRYWULT, J.; CORNER, L. A.; ROTHEL, J. S.; RADFORD, A. J. Rational Attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Potential Cheesy Gland Vaccine and Live Delivery Vehicle. **Infection and Immunity**. v. 60, n. 7, p. 2900-2005, 1992.

HODGSON, A. L. M.; TACHEDIJAN, M.; CORNER, L. A.; RADFORD, A. J.; Protection of Sheep against Caseous Lymphadenitis by Use of a Single Oral Dose of Live Recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Infection and Immunity**. v. 62, n. 12, p. 5275-5280, 1994.

HODGSON, A. L. M.; CARTER, K.; TACHEDIJAN, M.; KRYWULT, J.; CORNER, L. A.; McCOLL, M.; CAMERON, A. Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. **Vaccine**, v. 17, p. 802-808, 1999.

HOELZLE, L. E.; SCHERRR, T.; MUNTWYLER, J.; WITTENBRINK, M. M.; PHILIPP, W.; HOELZLE, K. Differences in the antigen structures of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the induced humoral immune response in sheep and goats. **Veterinary Microbiology**, v. 164, n. 3–4, p. 359–365, 2013. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.02.031

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **PPM-Pesquisa da Pecuária Municipal**, 2020. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?edicao=29151&t=destaques> . Acesso em: 20 de maio de 2022.

JUNTILA, I. S. Tuning the Cytokine Responses: An Update on interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes. **Frontiers in Immunology**. v.9, 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.00888

LAN, D. T. B.; TANIGUCHI, S.; MAKINO, S.; SHIRAHATA, T.; NAKANE, A. Role of Endogenous Tumor Necrosis Factor Alpha and Gamma Interferon in Resistance to

Corynebacterium pseudotuberculosis Infection in Mice. **Microbiology and Immunology**, v.42, n.12, p.863-870, 1998.

LEAL, K.S.; SILVA, M. T. de O.; REZENDE, A. de F. S.; BEZERRA, F. S. B.; BEGNINI, K.; SEIXAS, F.; COLLARES, T.; DELLAGOSTIN, O.; PORTELA, R. W.; AZEVEDO, V. A. de C.; BORSUK, S. Recombinant *M. bovis* BCG expressing the PLD protein promotes survival in mice challenged with a *C. pseudotuberculosis* virulent strain. **Vaccine**. v.36, p. 3578-3583, 2018. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.05.049

LEITE, M. L. Caseous Lymphadenitis (CL) in Goats and Sheep. **Alabama Cooperative Extension System**, 2012, p. 2

LIMA, D.; REBOUÇAS, M.; BASTOS, B.; COSTA-SILVA, M.; RAYNAL, J. T.; CARVALHO-FILHO, P.; VALE, V.; MOURA-COSTA, L.; TRINDADE, S.; PORTELA, R.; MEYER, R. Study of the Immune Response Induced by an Attenuated Strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Sheep Reared Under Extensive System. **EC Microbiology**. v.10, p. 63-71, 2017.

LINS, J. G. G.; MARQUES, A. V. M. de S.; RODRIGUES, S. D.; SOUZA, J. R. de; PORDEUS, G. O.; BONIFÁCIO, B. F. Perfil do ovinocultor no oeste do Alto Sertão Paraibano. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.12, n. 1, p.65-69, 2018.

LIU, G.; ZHANG, Y.; ZHANG, N.; NI, W.; JIE, J.; JIANG, L.; TAI, G. Escherichia coli maltose-binding protein (MBP) activates mouse Th1 through TLR2-mediated MyD88-dependent pathway and TLR4-mediated TRIF dependent pathway. **International Immunopharmacology**. v. 50, p. 338-344, 2017. doi: 10.1016/j.intimp.2017.07.016

LIU, D. T. L.; CHAN, W-M.; FAN, D. S. P.; LAM, D. S. C. An infected hydrogel buckle with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **The British Journal of Ophthalmology**. v. 89, p. 825-826, 2005. doi: 10.1136/bjo.2004.051698

LOCHT, C. The history of BCG. *In*: NOR, N.M; ACOSTA, A.; SARMIENTO, M.E. **The Art & Science of Tuberculosis Vaccine Development**. Malásia: Oxford Press, cap. 9, p.151-156, 2010.

LU, P.; FENG, M-G. Bifunctional enhancement of a β -glucanase-xylanase fusion enzyme by optimization of peptide linkers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 579-587, 2008. doi: 10.1007/s00253-008

LUCENA, C. C. de; MARTINS, E. C.; MAGALHÃES, K. A.; FILHO, Z. F. H. Produtos de origem caprina e ovina: mercado e potencialidades na região do semiárido brasileiro. **Boletim do centro de inteligência e mercado de caprino e ovinos**. Sobral, EMBRAPA Caprinos e Ovinos, n. 3, p. 6, 2018.

KALIL, M.A.; SANTOS, L.M.; BARRAL, T.D.; RODRIGUES, D.M.; PEREIRA, N.P.; SÁ, M.C.A.; UMSZA-GUEZ, M.A.; MACHADO, B.A.S; MEYER, R.; PORTELA, R.W. Brazilian green propolis as a therapeutic agent for the post-surgical treatment of caseous lymphadenitis in sheep. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, p. 399, 2019. doi: 10.3389/fvets.2019.00399

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Appendix VIII Blood Analyte Reference Values in Large Animals. *In*: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. San Diego: Academic Press, 6. ed. 2008. p. 888

KHORASANI, A.; MADADGAR, O.; SOLEIMANJAH, H.; KEYVANFAR, H.; MAHRAVANI, H. Evaluation of the efficacy of a new oil-based adjuvant ISA 61 VG FMD vaccine as a potential vaccine for cattle. **Iranian Journal of Veterinary Research**. v. 17, n. 1, p. 8-12, 2016.

KUMAR, J.; SINGH, F.; TRIPATHI, B. N.; KUMAR, R.; DIXIT, S. K.; SONAWANE, G. G. Epidemiological, bacteriological and molecular studies on caseous lymphadenitis in Sirohi goats of Rajasthan, India. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, p. 1319-1322, 2012. doi: 10.1007/s11250-012-0102-8

MCKEAN, S. C.; DAVIES, J. K.; MOORE, R. J. Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. **Microbiology**. v.153, p. 2203-2211, 2007. doi: 10.1099/mic.0.2007/005926-0

MAHMOOD, Z. K. H.; JESSE, F. F.; SAHAREE, A. A.; JASNI, S.; YUSOFF, R.; WAHID, H. Clinio-Pathological Changes in Goats Challenged with *Corynebacterium Pseudotuberculosis* and its Exotoxin (PLD). **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**. v.10, p.112-132, 2015. doi: 10.3844/ajavsp.2015.112.132

MAGALHÃES, K. A.; MARTINS, E. C.; LUCENA, C. C. de; HOLANDA FILHO, Z. F. Panorama da ovinocultura e da caprinocultura a partir do Censo Agropecuário 2017. **Boletim do centro de inteligência e mercado de caprino e ovinos**. Sobral, EMBRAPA Caprinos e Ovinos, n. 7, p. 14, 2018.

MATOS, A. C.; DIAS, A. P.; MORAIS, M.; FIGUEIRA, L.; MARTINS, M. H.; MATOS, M.; PINTO, M. L.; COELHO, A. C. Granuloma Coinfection with *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, and *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Five Hunted Red deer (*Cervus elaphus*) in Portugal. **Journal of Wildlife Diseases**. v. 51, p. 793-794, 2015. doi: 10.7589/2014-09-240

MEYER, R.; CARMINATI, R.; CERQUEIRA, R. B.; VALE, V.; VIEGAS, S.; MARTINEZ, T.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; SILVA, J. A. H.; RIBEIRO, M.; REGIS, L.; PAULE, B.; FREIRE, S. M. Avaliação da resposta imune humoral em caprinos inoculados com uma vacina viva atenuada liofilizada contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.1, n.1, p.42-48, 2002.

MOURA-COSTA, L. F.; BAHIA, R. CARMINATI, R.; VALE, V. C.; PAULE, B. J. A.; PORTELA, R. W.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I; SCHAER, R.; BARRETO, L. M. S.; MEYER, R. Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Canindé goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 126, p. 131-141, 2008. doi:10.1016/j.vetimm.2008.06.013

MOURA-COSTA, L. F. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 105-115, 2002. doi: 10.9771/cmbio.v1i1.4248

MOUSSA, I. M.; ALI, M. S.; HESSAIN, A. M.; KABLI, S. A.; HEMEG, H. A.; SELIM, S. A. Vaccination against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections controlling caseous lymphadenitis (CLA) and oedematousskin disease. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.23, p. 718-726, 2016. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.06.005

MORALLES, N.; ALDRIDGE, D.; BAHAMONDE, A.; CERDA, J.; ARAYA, C.; MUÑOZ, R.; SALDÍAS, M. E.; LECOCQ C.; FRESNO, M.; ABALOS, P.; RETAMAL, P. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Patagonian Huemul (*Hippocamelus bisulcus*). **Journal of Wildlife Diseases**. v.53, 2017. doi: 10.7589/2016-09-213

NASSAR, A. F. de C.; DANIEL, G. T.; RUIZ, R.; MIYASHIRO, S.; SCANNAPIECO, E. M.; NETO, J. de S.; GREGORY, L. Diagnostic comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* through microbiological culture and PCR in sheep samples. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 82, p. 1-6, 2015. doi: 10.1590/1808-1657000692013

NI, W.; ZHANG, Q.; LIU, G.; WANG, F.; YUAN, H.; GUO, Y.; ZHANG, X.; XIE, F.; LI, Q.; TAI, G. Escherichia coli maltose-binding protein activates mouse peritoneal macrophages and induces M1 polarization via TLR2/4 in vivo and in vitro. **International Immunopharmacology**. v. 21, p. 171-180, 2014. doi: 10.1016/j.intimp.2014.04.025

OECD-FAO. Meet. In: **OECD-FAO Agricultural Outlook 2018-2027**, Paris, FAO, p. 158, 2018. doi: 10.1787/agr_outlook-2018-en

OLI, A. N.; OBIALOR, W. O.; IFEANYICHUKWU, O. M.; ODIMEGWU, D. C.; OKOYEH, J. N.; EMECHEBE, G. O.; ADEJUMO, S. A.; IBEANU, G. C. Immunoinformatics

and Vaccine Development: An Overview. **Immuno Targets and Therapy**. v. 9, 2020. doi: 10.2147/ITT.S241064

OLIVEIRA, M.; BARROCO, C.; MOTTOLA, C.; SANTOS, R.; LENSADDEK, A.; TAVARES, L.; SEMEDO- LENSADDEK, T. First report of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from caseous lymphadenitis lesions in Black Alentejano pig (*Sus scrofa domesticus*). **BMC Veterinary Research**, v. 10, p. 218, 2014.

OREIBY, A.F. Diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goat. **Small Ruminant Research**, 2014. doi: 10.1016/j.smallrumres.2014.11.013

OSMAN, A. Y.; NORDIN, M. L.; KADIR, A. A.; SAHAREE, A. A. The Epidemiology and Pathophysiology of Caseous Lymphadenitis: A Review. **Journal of Veterinary Medicine and Research**. v. 5, p. 1129, 2018.

PACHECO, L. G. C.; PENA, R. R.; CASTRO, T. L. P.; DORELLA, F. A.; BAHIA, R. C.; CARMINATI, R.; FROTA, M. N. L.; OLIVEIRA, S. C.; MEYER, R.; ALVES, F. S. F.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 480–486, 2007. doi: 10.1099/jmm.0.46997-0

PALUDAN, S. R. Interleukin-4 and Interferon-g: The Quintessence of a Mutual Antagonistic Relationship. **Scandinavian Journal of Immunology**. v. 48, p. 459-468, 1998.

PATON, M. W.; WALKER, S. B.; ROSE, I. R.; WATT, G. F. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. **Australian Veterinary Journal**, v. 81, n. 1–2, p. 91–95, 2003

PAULE, B. J. A.; AZEVEDO, V.; REGIS, L. F.; CARMINATI, R.; BAHIA, C. R.; VALE, V. L. C.; MOURA-COSTA, L. F.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; GOES, A. M.; MEYER, R. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon-g production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 96, p. 129-139, 2003. doi: 0.1016/S0165-2427(03)00146-6

PEEL, M. M.; PALMER, G. G.; STACPOOLE, A. M.; KERR, T. G. Human Lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Report of ten cases from Australia and review. **Clinical Infectious Diseases**. v. 24, p.185-191, 1997.

PINHEIRO JUNIOR, J. W.; OLIVEIRA, A. A. da F.; ANDERLINI, G. A.; ABREU, S. R. de O.; VALENÇA, R. M. B.; MOTA, R. A. Aspectos sociais, higiênico-sanitários e

reprodutivos da ovinocultura de corte do Estado de Alagoas, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 5, n. 4, p. 600-605, 2010. doi: 10.5239/agraria.v5i4.631

PINHO, R. B. de; SILVA, M. T. de O.; BEZERRA, F. S. B.; BORSUK, S. Vaccines for caseous lymphadenitis: up-to-date and forward-looking strategies. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 2021. doi: 10.1007/s00253-021-11191-4

PINHO, J. M. R.; DORELLA, F. A.; COELHO, K. da S.; FONSECA, C. T.; CARDOSO, F. C.; MEYER, R.; PORTELA, R. W. D.; OLIVEIRA, S. C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Immunization with Recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis* Heat-Shock Protein (Hsp)-60 is Able to Induce an Immune Response in Mice, But Fails to Confer Protection Against Infection. **The Open Veterinary Science Journal**. v. 3, p. 22-27, 2009.

PRATT, S. M.; SPIER, S. J; CARROL, S. P.; VAUGHAN, B.; WHITCOMB, B.; WILSON, W. D. Evaluation of clinical characteristics, diagnostic test results, and outcome in horses with internal infection caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*: 30 cases (1995–2003). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 227, n. 3, p. 441-448, 2005. doi: 10.2460/javma.2005.227.441

PRESCOTT, J. F.; MENZIE, P. I.; HWANG, Y-T. An interferon-gamma assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult sheep from a research flock. **Veterinary Microbiology**. v. 88, p. 287-297, 2002.

QUINN, J. P.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. São Paulo: Artmed, p. 67-70, 2007.

RADOSTITS, O. M. GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W. & CONSTABLE, P. D. **Veterinary Medicine**. Edinburgh: W. B. Saunders, 2007. 10^o ed., p.795-800.

RADWAN, A. I.; EL-MAGAWRY, S.; HAWARI, A.; AL-BEKAIRI, S. I.; REBLEZA, R. M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* in camels (*Camelus dromedarius*) in Saudi Arabia. **Tropical Animal Health and Production**. v.21, p. 229-230, 1989.

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. **Vaccine**, v. 19, p. 2688-2691, 2001.

RAZALI, N.; HOHJOH, H.; INAZUMI, T.; MAHARJAN, B. D.; NAKAGAWA, K.; KONISHI, M.; SUGIMOTO, Y.; HASEGAWA, H. Induced Prostanoid Synthesis Regulates the Balance between Th1- and Th2-Producing Inflammatory Cytokines in the Thymus of Diet-Restricted Mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 43, n. 4, p.649-662, 2020.

REBOUÇAS, M.; PORTELA, R. W.; LIMA, D. D.; LOUREIRO, D.; BASTOS, B. L.; MOURA-COSTA, L. F.; VALE, V. L.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; MEYER, R. *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted antigen-induced specific gamma-interferon

production by peripheral blood leukocytes: potential diagnostic marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.23, p. 213-220, 2011. doi: 10.1177/104063871102300204

REYNISSON, B.; ALVAREZ, B.; PAUL, S.; PETERS, B.; NIELSEN, M. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. **Nucleic Acids Research**, v. 48, p. W449-W454, 2020. doi: 10.1093/nar/gkaa379.

REZENDE, A. F. S.; BRUM, A. A.; BEZERRA, F. S. B.; BRAITE, D. C.; SÁ, G. L.; THUROW, H. S.; SEIXAS, F. K.; AZEVEDO, V. A. C.; PORTELA, R. W.; BORSUK, S. Assessment of the acid phosphatase CP01850 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit vaccine formulations against caseous lymphadenitis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 72, n. 1, p. 199-207, 2020. doi: 10.1590/1678-4162-10790

RIBEIRO, O. C.; SILVA, J. A. H. da; OLIVEIRA, S.C.; MEYER, R.; FERNANDES, G. B. Dados preliminares sobre uma vacina viva contra linfadenite caseosa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 26, n. 4, p. 461-465, 1991

RIBEIRO, M.G.; DIAS JUNIOR, J.G.; PAES, A.C.; BARBOSA, P.G.; NARDI JUNIOR, G.; LISTONI, F.J.P. Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico da *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, São Paulo, v.68, n.1, p.23-28, 2001.

RIBEIRO, D.; DORELLA, F. A.; PACHECO, L. G. C.; SEYFFERT, N.; CASTRO, T. L. de P.; PORTELA, R.W.D.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; AZEVEDO, V. Subclinical Diagnosis of Caseous Lymphadenitis Based on ELISA in Sheep from Brazil. **Bacteriology & Parasitology**. v. 4, 2013. doi: 10.4172/2155-9597.1000170

RIBEIRO, D.; ROCHA, F. S.; LEITE, K.M.C.; SOARES, S.C.; SILVA, A.; PORTELLA, R. W. D.; MAYER, R.; MIYOSHI, A.; OLIVEIRA, S.C.; AZEVEDO, V.; DORELLA, F. A. An iron-acquisition-deficient mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis* efficiently protects mice against challenge. **Veterinary Research**, v.45, n.28, 2014. doi: 10.1186/1297-9716-45-28

ROSLINDAWANI, M. N.; SYAFIQA, A. S.; JESSE, F. F. A.; EFFENDY, A. W.; ZAMRI-SAAD, M. Recombinant caseous lymphadenitis vaccine with palm oil as adjuvant enhances the humoral and cell-mediated immune responses in rat model. **Journal of Animal Health and Production**. v. 4, p. 22, 2016. doi: 10.14737/journal.jahp/2016/4.1.22.25

ROSSI, R. The sheep and goat sector in the EU. **European Parliamentary Research Service**. p.2, 2017.

SÁ, M. da C. A.; VESCHI, J. A.; DANTOS, G. B.; AMANSO, E. S.; OLIVEIRA, S. A. S.; MOTA, R. A.; VENERONI-GOUVEIA, G.; COSTA, M. M. Activity of disinfectants and biofilm production of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n.11, p.1319-1324, 2013. doi: 10.1590/S100-736X2013001100006

SANTIAGO, L. B.; PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F.; do SANTOS, V. W. S.; RODRIGUES, A. de S.; LIMA, A. M. C.; de OLIVEIRA, E. L.; de ALBUQUERQUE, F. H. M. A. R. In vivo evaluation of antiseptics and disinfectants on control of Caseous Lymphadenitis: clinical, hematological, serological and microbiological monitoring. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, p. 273–280, 2013. doi: 10.1590/S1808-16572013000300003

SANTOS, L. M.; STANISIC, D.; MENEZES, U. J.; MENDONÇA, M. A.; BARRAL, T.D.; SEYFFERT, N.; AZEVEDO, V.; DURÁN, N.; MEYER, R.; TASIC, L.; PORTELA, R.W. Biogenic silver nanoparticles as a post-surgical treatment for *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in small ruminants. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 824, 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.00824

SCHRODER, K.; HERTZOG, P. J.; RAVASI, T.; HUME, D. A. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 75, p. 163-189, 2004. doi: 10.1189/jlb.0603252

SELLERA, F. P.; GARGANO, R. G.; LIBERA, A. M. M. P. D.; BENESI, F. J.; AZEDO, M. R.; SÁ, L. R. M. de; RIBEIRO, M. S.; BAPTISTA, M. da S.; POGLIANI, F. C. Antimicrobial photodynamic therapy for caseous lymphadenitis abscesses in sheep: Report of ten cases. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 13, p. 120-122, 2016. doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.12.006

SELIM, S. A.; GHONEIM, M. E.; MOHAMED, K. F. Vaccinal efficacy of genetically inactivated phospholipase D against caseous lymphadenitis in small ruminants. **International Journal of Microbiological Research**, v. 1, p. 129-136, 2010.

SELIM, S. A.; SYAME, S. M.; EBESSY, E. A.; EFFAT, M. M.; HAKIM, A. S.; BALATA, M. A. Evaluation of Protective Efficacy of Mixed PLD Toxoid and Clostridial Vaccines Against Caseous Lymphadenitis (CLA) in Small Ruminants at Egypt. **International Journal of Microbiological Research**, v. 7, n. 3, p. 102-113, 2016. doi: 10.5829/idosi.ijmr.2016.102.113

SHADNEZHAD, A.; NAEGELI, A.; COLLIN, M. CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* is an endo- β -N-acetylglucosaminidase. **BMC Microbiology**, v. 16, p.261, 2016. doi: 10.1186/s12866-016-0884-3

SILVA, M. T. de O.; PINHO, R. B. de; BEZERRA, F. S. B.; SCHOLL, N. L.; MORON, L. D.; ALVES, M. S. D.; WOLOSKI, R. dos S.; KREMER, F. S.; BORSUK, S. *In silico* analyses and design of a chimeric protein containing epitopes of SpaC, PknG, NanH, and SodC proteins for the control of caseous lymphadenitis. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 105, p. 8277-8286, 2021. doi: 10.1007/s00253-021-11619-x

SILVA, J. W.; DROPPA-ALMEIDA, D.; BORSUK, S.; AZEVEDO, V.; PORTELA, R.W.; MIYOSHI, A.; ROCHA, F. S.; DORELLA, F. A.; VIVAS, W. L.; PADILHA, F. F.; HERNANDEZ-MACEDO, M. L.; LIMA-VERDE, I. B. *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40 recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis. **BMC Veterinary Research**. v. 10, p. 965, 2014. doi: 10.1186/s12917-014-0304-6

SINGH, R.; KUMARI, S.; YADAV, J. P.; SINGH, S.; KUMAR, A.; KUMAR, S. Suppurative Pneumonia and Lymphadenitis in a Goat Associated with Infection by *Corynebacterium Pseudotuberculosis*– A Case Study. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**. v.5, p.405, 2017. doi: 10.17582/journal.aavs/2017/5.10.405.409

SIMMONS, C. P.; DUNSTAN, S. J.; TACHEDJIAN, M.; KRYWULT, J.; HODGSON, A. L. M.; STRUGNELL, R. A.; Vaccine Potential of Attenuated Mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Sheep. **Infection and Immunity**. v. 66, n. 2, p. 474-479, 1998.

SMITH, M. C.; SHERMAN, D. M. Subcutaneous Swellings. *In: Goat Medicine*. Singapore: U.S. Library of Congress, 2009. 2^a ed. p.63-67.

SENTURK, S.; TEMIZEL, M. Clinical efficacy of rifamycin SV combined with oxytetracycline in the treatment of caseous lymphadenitis in sheep. **Veterinary Records**, v. 159, n. 7, p. 216–217, 2006. doi: 10.1136/vr.159.7.216

SONGER, J. G.; BECKENBACH, K.; MARSHALL, M. M.; OLSON, G. B.; KELLEY, L. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, p. 223-226, 1988.

SOOD, N. K.; SANDHU, B. S.; GUPTA, K.; NARANG, D.; VASUDEVA, K.; SINGH, N. D. Mesenteric caseous lymphadenitis in a cow calf caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*: a case report. **Veterinarni medicina**, v. 57, p. 371-375, 2012.

TARAZI, Y. H.; AL-ANI, F.K. An outbreak of dermatophilosis and caseous lymphadenitis mixed infection in camels (*Camelus dromedaries*) in Jordan. **The Journal of Infections in Developing Countries**. v.10, p. 506-511, 2016. doi: 10.3855/jidc.7023

TEIXEIRA, W. C.; SANTOS, H. P.; SILVA, J. C. R.; RIZZO, H.; MARVULO, F. V.; CASTRO, R. S. de. Perfil zoonitário em três mesorregiões do estado do Maranhão, Brasil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 9, n. 1, p. 34-42, 2015.

TEJEDOR, M. T.; MARTIN, J. L.; CORBERA, S.; GUTIERREZ, C. *pseudotuberculosis* in Dromedary Camels in Canary Islands. **Tropical Animal Health and Production**. v. 36, p. 459-462, 2004.

TEJEDOR-JUNCO, M. T.; LUPIOLA, P.; SCHULZ, U.; GUTIERREZ, C. Isolation of nitrate-reductase positive *Corynebacterium pseudotuberculosis* from dromedary camels. **Tropical Animal Health and Production**. v. 40, p. 165-167, 2008. doi: 10.1007/s11250-007-9077-2

TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.60, p.523-533, 2003. doi: 10.1007/s00253-002-1158-6

TORCHALA, M.; MOAL, I. H.; CHALEIL, R. A. G.; FERNANDEZ-RECIO, J.; BATES, P. A. SwarmDock: a server for flexible protein–protein docking. **Bioinformatics**, v. 29, p. 807-809, 2013. doi: 10.1093/bioinformatics/btt038

UNANIAN, M. M.; SILVA, A. E. D. F.; PANT, K. P. Abscesses and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid North-east Brazil. **Tropical Animal Health Production**, 1985, v.17, p.57-62. doi: 10.1007/BF02356137

VALE, V. L. C.; SILVA, M. da C.; SOUZA, A. P. de; TRINDADE, S. C.; MOURA-COSTA, L. F. de; SANTOS-LIMA, E. K. N. dos; NASCIMENTO, I. L. de O.; CARDOSO, H. S. P.; MARQUES, E. de J.; PAULE, B. J. A.; NASCIMENTO, R. J. M. Humoral and cellular immune responses in mice against secreted and somatic antigens from a *Corynebacterium pseudotuberculosis* attenuated strain: Immune response against a *C. pseudotuberculosis* strain. **BMC Veterinary Research**, v.12, p.195, 2016. doi: 10.1186/s12917-016-0811-8

VESCHI, J. L. A.; RAMOS, E. M.; ZAFALON; L. F. **Linfadenite caseosa: sinais clínicos, localização dos principais linfonodos acometidos, recomendações para prevenção e controle**. Petrolina: EMBRAPA Semiárido, dezembro, 2015.

VESCHI, J. L. A. Manejo sanitário de doenças infecciosas. *In*: VOLTOLINI, T. V. **Produção de caprinos e ovinos no Semiárido**, Petrolina: EMBRAPA Semiárido, 2011, cap. 14, p. 336- 342.

VOLTOLINI, T. V.; SANTOS, R. M.; MORAES, S. A.de; ARAUJO, G. G. L. de Principais modelos produtivos na criação de caprinos e ovinos. *In*: VOLTOLINI, T. V. **Produção de Caprinos e Ovinos no Semiárido**, Petrolina, EMBRAPA Semiárido, 2011, cap. 9, p. 219- 220.

WALLACE, A. C.; LASCOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein engineering**. p. 127-134, 1995. doi: 10.1093/protein/8.2.127.

WALKER, J.; JACKSON, J.; EGEGLETON, D. G.; MEEUSEN, E.N.T; WILSON, M. J.; BRANDON, M. R. Identification of a Novel Antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* That Protects Sheep against Caseous Lymphadenitis. **Infection and Immunity**, v.62, n. 6, p. 2562-2567, 1994.

WANG, P.; SIDNEY, J.; DOW, C.; MOTHÉ, B.; SETTE, A.; PETERS, B. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. **PLoS Computational Biology**, v.4, n. 4, 2008. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000048.

WANG, W.; YUAN, H-Y.; LIU, G-M.; NI, W-H.; WANG, F.; TAI, G-X. Escherichia coli Maltose-Binding Protein Induces M1 Polarity of RAW264.7 Macrophage Cells via a TLR2- and TLR4-Dependent Manner. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 16, n. 5, p. 9896-9909, 2015. doi: 10.3390/ijms16059896.

WASHBURN, K. E.; FAJT, V. R.; LAWHON, S. D.; ADAMS, L. G.; TELL, L. A.; BISSETT, W. T. Caprine abscess model of tulathromycin concentrations in interstitial fluid from tissue chambers inoculated with *Corynebacterium pseudotuberculosis* following subcutaneous or intrachamber administration. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 12, p. 6295–6304, 2013. doi: 10.1128/AAC.00936-13

WERNERY, U.; KINNE, J. Caseous Lymphadenitis (Pseudotuberculosis) in Camelids: A Review. **Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry**. v. 3, 2016.

WILLIAMSON, L. H. Caseous Lymphadenitis in Small Ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 17, n. 2, p. 359–371, 2001. doi: 10.1016/S0749-0720(15)30033-5

ZHU, T.; MENG, F.; YAO, H.; WANG, Y.; JIAO, X.; YIN, Y. ISA 61 VG adjuvant enhances protective immune response of *Listeria monocytogenes* inactivated vaccine. **Chinese Journal of Biotechnology**. v. 36, n. 7, p. 1378-1385, 2020. doi: 10.13345/j.cjb.190487

ANEXOS

ARTIGOS PUBLICADOS NO PERÍODO DO DOUTORADO

1 - Brazilian Green Propolis as a Therapeutic Agent for the Post-surgical Treatment of Caseous Lymphadenitis in Sheep. **Kalil MA**, Santos LM, Barral TD, Rodrigues DM, Pereira NP, Sá MDCA, Umsza-Guez MA, Machado BAS, Meyer R, Portela RW. *Front Vet Sci.* 2019 Nov 26;6:399. doi: 10.3389/fvets.2019.00399. (Impact Factor 3.471, Qualis A2)



ORIGINAL RESEARCH
published: 26 November 2019
doi: 10.3389/fvets.2019.00399



Brazilian Green Propolis as a Therapeutic Agent for the Post-surgical Treatment of Caseous Lymphadenitis in Sheep

Mauricio Alcântara Kalil¹, Laerte Marlon Santos¹, Thiago Doria Barral¹, Daniela Méria Rodrigues¹, Nella Paufa Pereira², Maria da Conceição Aquino Sá¹, Marcelo Andres Umsza-Guez¹, Bruna Aparecida Souza Machado³, Roberto Meyer¹ and Ricardo Wagner Portela^{1*}

¹Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Bahia, Salvador, Brazil, ²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Bahia, Salvador, Brazil, ³Centro Universitário SENAI-CIMATEC, Instituto de Tecnologias da Saúde, Salvador, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Francesca Mancianti,
University of Pisa, Italy

Reviewed by:

Piotr Świdziński,
Gdańsk University of
Technology, Poland
Fabrizio Zerfakoni,
University of Pisa, Italy

*Correspondence:

Ricardo Wagner Portela
rportela@ufba.br

Specialty section:

This article was submitted to
Veterinary Infectious Diseases,
a section of the journal
Frontiers in Veterinary Science

Received: 26 August 2019

Accepted: 28 October 2019

Published: 26 November 2019

Citation:

Kalil MA, Santos LM, Barral TD,
Rodrigues DM, Pereira NP, Sá MDCA,
Umsza-Guez MA, Machado BAS,
Meyer R and Portela RW (2019)
Brazilian Green Propolis as a
Therapeutic Agent for the
Post-surgical Treatment of Caseous
Lymphadenitis in Sheep.
Front. Vet. Sci. 6:399.
doi: 10.3389/fvets.2019.00399

As antibiotics are ineffective when used to treat caseous lymphadenitis, the surgical excision of lesions is often required. Iodine solution (10%) is currently the choice for the post-surgical treatment; however, it may cause histotoxicity. Propolis are resinous substances composed by a mixture of different plants parts and molecules secreted by bees. As green propolis has already proven to possess anti-bacterial and wound healing properties, this study aimed to evaluate the use of a green propolis-based ointment as a therapeutic agent for the post-surgical treatment of caseous lymphadenitis. The caseous lesions of 28 sheep were surgically excised before dividing animals into two groups: (1) iodine-treated animals and (2) sheep treated with an ointment made with a previously characterized green propolis extract. Clinical data of animals, size of the scar area, the presence of moisture and secretion in the surgical wound, the humoral immune response against the bacterium and the susceptibility of *C. pseudotuberculosis* clinical isolates to the green propolis extract were analyzed. The green propolis-treated group presented complete healing of the surgical wound 1 week before the iodine-treated group. Additionally, animals treated with the green propolis ointment had fewer cases of wound secretion, but it was not statistically different from the iodine-treated group. No clinical signs indicating green propolis toxicity or other side effects were found, associated with a faster and more organized hair recovery by propolis use. The green propolis extract was able to inhibit the growth of 23 from the 27 *C. pseudotuberculosis* clinical isolates, with minimum inhibitory and minimum bactericide concentrations ranging from 01 to 08 mg/mL, and did not interfere with the humoral immune response against the bacterium. In addition, green propolis was able to inhibit biofilm formation by four of the *C. pseudotuberculosis* clinical isolates. We concluded that green propolis is a promising therapeutic agent to be used in the post-surgical treatment of caseous lymphadenitis in small ruminants due to its effects on surgical wound healing, hair recovery, inhibition of wound contamination and bacterial growth.

Keywords: anti-microbials, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, natural products, sheep, wound healing

2- Activity of Ethanolic and Supercritical Propolis Extracts in *Corynebacterium pseudotuberculosis* and Its Associated Biofilm. Santos LM, Rodrigues DM, Kalil MA, Azevedo V, Meyer R, Umsza-Guez MA, Machado BA, Seyffert N, Portela RW. *Front Vet Sci.* 2021 Sep 1;8:700030. doi: 10.3389/fvets.2021.700030. (Impact Factor 3.471, Qualis A2).



Activity of Ethanolic and Supercritical Propolis Extracts in *Corynebacterium pseudotuberculosis* and Its Associated Biofilm

Laerte Marlon Santos^{1,2}, Daniela Mória Rodrigues¹, **Mauricio Alcantara Kalil¹**, Vasco Azevedo³, Roberto Meyer¹, Marcelo Andres Umsza-Guez⁴, Bruna Aparecida Machado⁵, Nubia Seyffert¹ and Ricardo Wagner Portela^{6*}

OPEN ACCESS

Edited by:
Indrani Samanta,
West Bengal University of Animal and
Fishery Sciences, India

Reviewed by:
Kenneth James Genovese,
United States Department of
Agriculture, United States
Luis A. Salazar,
University of La Frontera, Chile
Naimane Segueni,
Université Frères Mentouri
Constantine 1, Algeria
Marcus Vinícius Das Sours,
Pitagoras College, Brazil

***Correspondence:**
Ricardo Wagner Portela
rportela@ufba.br

Specialty section:
This article was submitted to
Veterinary Infectious Diseases,
a section of the journal
Frontiers in Veterinary Science

Received: 26 April 2021
Accepted: 26 July 2021
Published: 01 September 2021

Citation:
Santos LM, Rodrigues DM, Kalil MA,
Azevedo V, Meyer R,
Umsza-Guez MA, Machado BA,
Seyffert N and Portela RW (2021)
Activity of Ethanolic and Supercritical
Propolis Extracts in
Corynebacterium pseudotuberculosis
and Its Associated Biofilm.
Front. Vet. Sci. 8:700030.
doi: 10.3389/fvets.2021.700030

¹Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil, ²Instituto de Tecnologia em Saúde, CIMAT/IC-SENAI, Salvador, Brazil, ³Laboratório de Genética Celular e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁴Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

Corynebacterium pseudotuberculosis is the etiological agent of caseous lymphadenitis in small ruminants, a chronic disease characterized by the development of granulomas in superficial and visceral lymph nodes as well as in several organs. An important characteristic of the infection with this bacterium is the formation of a biofilm and the absence of effective antibiotic therapy against the disease. From this scenario, the objective of this study was to evaluate the susceptibility of *C. pseudotuberculosis* to conventional antibiotics and to red, green, and brown propolis extracts obtained by the supercritical and ethanolic extraction methods as well as its activity in the bacterial biofilm. The results of the sensitivity test using antibiotics indicated a sensitivity of *C. pseudotuberculosis* strains to the antimicrobial agents. The ethanolic extract of green propolis and the supercritical red propolis extract showed the best antibacterial activities against planktonic *C. pseudotuberculosis*. A lower antimicrobial activity of the brown propolis extract was identified. Propolis extracts were effective in interfering with the formation of the *C. pseudotuberculosis* biofilm but had little activity on the consolidated biofilm. In conclusion, propolis extracts are more effective against *C. pseudotuberculosis* in the planktonic stage, being able to interfere with the formation of bacterial biofilm. However, the action of propolis extracts in a sessile and structured microbial biofilm is reduced.

Keywords: caseous lymphadenitis, small ruminants, microbial resistance, natural extracts, supercritical extraction

INTRODUCTION

Corynebacterium pseudotuberculosis is a Gram-positive and intracellular bacterium that causes caseous lymphadenitis (CLA) in small ruminants, a chronic disease characterized by the development of granulomas in superficial and visceral lymph nodes as well as in several organs. CLA causes weight loss, reduced production of milk, and a decrease of the commercial value of the

3-Immunoprophylactic properties of the *Corynebacterium pseudotuberculosis*-derived MBP:PLD:CP40 fusion protein. Barral TD, **Kalil MA**, Mariutti RB, Arni RK, Gismene C, Sousa FS, Collares T, Seixas FK, Borsuk S, Estrela-Lima A, Azevedo V, Meyer R, Portela RW. Applied Microbiology and Biotechnology. (Impact Factor 5.560, Qualis A1).

Applied Microbiology and Biotechnology
<https://doi.org/10.1007/s00253-022-12279-1>

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS AND PROCESS ENGINEERING



Immunoprophylactic properties of the *Corynebacterium pseudotuberculosis*-derived MBP:PLD:CP40 fusion protein

Thiago Doria Barral¹ · Mauricio Alcantara Kalil¹ · Ricardo Barros Mariutti² · Raghuvir Krishnaswamy Arni² · Carolina Gismene² · Fernanda Severo Sousa³ · Tiago Collares³ · Fabiana Kommling Seixas³ · Sibeles Borsuk³ · Alessandra Estrela-Lima⁴ · Vasco Azevedo⁵ · Roberto Meyer¹ · Ricardo Wagner Portela¹

Received: 21 June 2022 / Revised: 21 October 2022 / Accepted: 4 November 2022
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

Caseous lymphadenitis (CLA) is a disease that affects small ruminants, and the best way to prevent its spread on a herd is through immunoprophylaxis. Thus, we aimed to evaluate the MBP:PLD:CP40 fusion protein as a new CLA immunogen. The fusion protein was constructed by combining *Corynebacterium pseudotuberculosis* PLD and CP40 proteins with maltose-binding protein (MBP) as an intrinsic adjuvant. The antigenicity, allergenic potential, prediction of B epitopes, binding to MHC receptors, and docking on the Toll-Like 2 receptor were evaluated in silico. MBP:PLD:CP40 was expressed and purified. 40 BALB/c were divided into four groups (G1 – control, G2 – Saponin, G3 – MBP:PLD:CP40, and G4 – rPLD + rCP40). Total IgG, IgG1, and IgG2a were quantified, and the expressions of cytokines after splenocyte in vitro stimulation were assessed. Mice were challenged 42 days after the first immunization. The in silico analysis showed that MBP:PLD:CP40 has immunogenic potential, does not have allergic properties, and can dock on the TLR2 receptor. MBP:PLD:CP40 stimulated the production of IgG1 antibodies in a fivefold proportion to IgG2a, and TNF and IL-17 were significantly expressed in response to the antigenic stimuli. When rPLD and rCP40 were used together for immunization, they could induce IFN- γ and IL-12, but with no detectable antibody production. The G3 and G4 groups presented a survival of 57.14% and 42.86%, respectively, while the G1 and G2 mice were all dead 15 days after the challenge. MBP:PLD:CP40 partially protected the mice against *C. pseudotuberculosis* infection and can be considered a potential new CLA immunogen.

Key points

- The fusion protein induced more IgG1 than IgG2a antibodies;
- The fusion protein also induced the expression of the TNF and IL-17 cytokines;
- Mice inoculated with MBP:PLD:CP40 presented a 57.14% survival.

Keywords Caseous lymphadenitis · Immunoinformatics · Vaccine development · Recombinant proteins

ARTIGOS SUBMETIDOS

1- Hematological and clinical biochemistry profiles in Canindé goats infected by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and bred in a tropical semi-arid region. Nicoleti JL, Façanha DA, **Kalil MA**, Fonseca EP, Barral TB, Sampaio JR, Ferreira J, Meyer R, Portela RW. Tropical Animal Health and Production (Revisores respondidos). (Impact Factor 1.91, Qualis A3).

Tropical Animal Health and Production
Hematological and clinical biochemistry profiles in Canindé goats infected by
Corynebacterium pseudotuberculosis and bred in a tropical semi-arid region
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	TROP-D-22-00181R1	
Full Title:	Hematological and clinical biochemistry profiles in Canindé goats infected by Corynebacterium pseudotuberculosis and bred in a tropical semi-arid region	
Article Type:	Short Communications	
Corresponding Author:	Ricardo Wagner Portela, PhD ICS/UFBA: Universidade Federal da Bahia Instituto de Ciencias da Saude Salvador, Bahia BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	ICS/UFBA: Universidade Federal da Bahia Instituto de Ciencias da Saude	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Jorge Luis Nicoleti, PhD	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Jorge Luis Nicoleti, PhD	
	Debora Andrea Façanha, PhD	
	Mauricio Alcantara Kalil, MSc	
	Elanne Paiva Fonseca, MSc	
	Thiago Doria Barral, MSc	
	Julia Ramos Sampaio, MSc	
	Josiel Ferreira, PhD	
	Roberto Meyer, MD PhD	
	Ricardo Wagner Portela, PhD	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	FAPEX (Continuous Resources) Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (313350/2019-1)	Dr Jorge Luis Nicoleti Dr Ricardo Wagner Portela

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal da Bahia
Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia
Comitê de Ética no Uso de Animais
 Av. Ademar de Barros, 500 - Ondina-40170-110 Salvador-BA
 (071) 3283-6701/6702/6718
ceua.ufba@ufba.br



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "PROTEÍNA DE FUSÃO PLD:CP40 PARA O DIAGNÓSTICO DA INFADENTE CASEOSA EM PEQUENOS RUMINANTES E ESTUDOS IMUNOPROFILÁTICOS EM MODELO MURINO E EM OVINOS", registrada com o nº 19/2021, sob a responsabilidade do pesquisador RICARDO WAGNER DIAS PORTELA, e que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, em reunião de 21.06.2021.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa <input type="checkbox"/> Extensão
Vigência da autorização	01/09/2021 à 31/08/2023
Espécie/linhagem/raça	Camundongos (<i>Mus musculus</i>) e Ovinos (<i>Ovis aries</i>)
Nº de animais	Camundongos: 50 Ovinos: 30 Total: 80 animais
Peso/Idade	Não informado / 2 meses
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Camundongos – Biotério Comercial - Granja R.G. Agropecuária Animais e Derivados; Ovinos - Unidades de produção de pequenos ruminantes da região sisaleira.

Salvador, 15/07/2021

LÚCIO LEOPOLDO ARAÚJO DA SILVA
 Coordenador CEUA/MEVZ