

RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR ANTÍGENOS DE *Mycoplasma hyopneumoniae* AVALIADOS COMO VACINAS DE DNA E DE SUBUNIDADE RECOMBINANTE

GOMES, Charles Klazer¹; GALLI, Vanessa¹; MARCHIORO, Silvana Beutinger¹; FISCH, Andressa¹; DELLAGOSTIN, Odir Antônio¹

¹Laboratório de Biologia Molecular – CDTEC, UFPEL - Centro de Biotecnologia/UFPEL, Campus Capão do Leão, Caixa Postal 354 – Pelotas – RS, CEP 96010-900. charlesklazer@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente etiológico da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), uma doença respiratória crônica e endêmica no mundo todo, que coloniza o epitélio respiratório ciliar, comprometendo a sua integridade e tornando-o suscetível a infecções secundárias e oportunistas (THACKER et al., 1999). A PES é usualmente controlada com o uso de antibióticos e procedimentos de manejo animal, no entanto, a vacinação é considerada a forma mais eficiente de controle (ROSS et al., 1986). Apesar de existirem vacinas comerciais (bacterinas), as mesmas fornecem apenas uma proteção parcial (STRAIT et al., 2008), além disso, não são produzidas no Brasil e apresentam um elevado custo de produção (ROSS, 1999). Desta forma, o desenvolvimento de alternativas para a profilaxia da PES é fundamental para a melhoria da sanidade dos suínos. Diferentes antígenos e estratégias vacinais têm sido testados, porém somente dois foram avaliados em ensaio de imunoproteção em suínos, resultando em proteção parcial (CHEN et al., 2003). Desta forma, a identificação e caracterização de novos antígenos de *M. hyopneumoniae*, bem como de formulações vacinais que induzam a produção de anticorpos protetores representam um passo importante para o controle da PES.

Com este fim, nosso grupo de pesquisa realizou a análise da antigenicidade de 35 proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* expressas em *Escherichia coli* e a imunogenicidade das mesmas em camundongos (SIMIONATTO et al, 2009, 2010). Este estudo permitiu identificar algumas delas para uso como potenciais antígenos vacinais, tais como a chaperona molecular DnaK (proteína de choque térmico P42), a proteína de superfície de membrana P46, a proteína transportadora P37 e a proteína de membrana P95.

Esse trabalho teve por objetivo avaliar a resposta imune humoral dos antígenos de *M. hyopneumoniae* P37, P42, P46 e P95 quando administrados em camundongos na forma de vacinas de DNA e de vacinas de subunidade recombinante.

2 METODOLOGIA

2.1 Desenvolvimento das vacinas de DNA e subunidade recombinante

A sequência codificadora dos antígenos P37, P42, P46 e P95 foram amplificadas por PCR a partir do DNA genômico de *M. hyopneumoniae* 7448, sendo os alvos MHP0246 (P37) e MHP0513 (P46) previamente submetidos à mutagênese sítio-dirigida (Simionatto et al., 2009). Os *amplicons* resultantes foram ligados aos vetores pAE e pcDNA3. Para a obtenção das vacinas de DNA, os vetores pcDNA3 recombinantes foram propagados em *E. coli* TOP10 e purificados com NucleoBond® Xtra Maxi kit (MACHEREY-NAGEL). As vacinas de subunidade recombinantes foram

geradas através da transformação dos vetores pAE recombinantes em *E. coli* BL21 (DE3) RIL, seguido da expressão e purificação das proteínas recombinantes conforme GALLI (2011).

2.2 Imunização dos camundongos

Para avaliação da imunogenicidade das vacinas recombinantes, camundongos BALB/c fêmeas com 6 a 8 semanas de vida foram imunizados. Os grupos foram assim distribuídos: 1 - pcDNA3/P37; 2 - pcDNA3/P42; 3 - pcDNA3/P46; 4 - pcDNA3/P95; 5 - P37, 6 - P42; 7 - P46, 8 - P95, 9 – RespiSure® (Pfizer) (controle positivo); 10 – solução salina 0.85% suplementada com hidróxido de alumínio 15% (controle negativo para vacinas de subunidade); 11 – vetor pcDNA3 (controle negativo para vacinas de DNA). As vacinas de subunidade recombinante foram suplementadas com o adjuvante hidróxido de alumínio 15%. Foram administradas duas doses por via intramuscular contendo 50 µg de proteína ou DNA recombinante com 21 dias de intervalo entre elas. Trinta minutos antes da inoculação das vacinas de DNA, foram administrados 50 µl de sacarose (25%), visando à estimulação das células locais do sistema imune. O sangue dos animais foi coletado do sino retro-orbital nos dias 0 (pré-imune), 21, 42, 63 e 84 pós-imunização. O soro foi separado por centrifugação e armazenado à -20 °C. No dia 84 os animais foram sacrificados. Os animais foram mantidos durante o experimento de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas.

2.3 Resposta imune humoral

A produção de anticorpos contra as proteínas recombinantes no soro dos camundongos imunizados foi verificada por ELISA indireto. Placas de 96 cavidades foram sensibilizadas com 100 ng das proteínas recombinantes dissolvidas em tampão carbonato/bicarbonato. Após incubação *overnight*, as placas foram lavadas três vezes com solução fosfato salina contendo 0,05 % (v/v) de Tween 20 (PBS-T) e incubadas com 200 µL de solução de bloqueio (leite em pó desnatado 5%) a 37 °C por 2 h. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS-T e incubadas com soro dos camundongos imunizados (1:100 em solução de bloqueio) a 37 °C por 2 h. Após nova lavagem, as cavidades foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:4000 em tampão de bloqueio) a 37 °C por 1 h. A reação colorimétrica foi gerada com a adição de *orthophenylenediamine dihydrochloride* (Sigma) e peróxido de hidrogênio. Após 15 min, a reação foi parada com a adição de 50 µL de 2 M H₂SO₄. A absorbância foi determinada em filtro de 492 nm em leitor de microplacas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os genes selecionados foram amplificadas por PCR e clonadas com sucesso nos vetores pAE e pcDNA3. As construções com o vetor pcDNA3 apresentaram alta pureza (A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 2,2) e concentração satisfatória, entre 500 e 2500 µg/l (Fig. 1A). Os plasmídeos recombinantes contendo o vetor pAE foram transformados em *E. coli* BL21 (DE3) RIL e as respectivas proteínas purificadas do extrato insolúvel de *E. coli*, tornando necessária a solubilização das mesmas em 8 M uréia. As proteínas recombinantes mostraram-se puras em SDS-PAGE 12% (Fig. 1B), demonstrando que o protocolo de purificação de proteínas recombinantes utilizado foi eficiente.

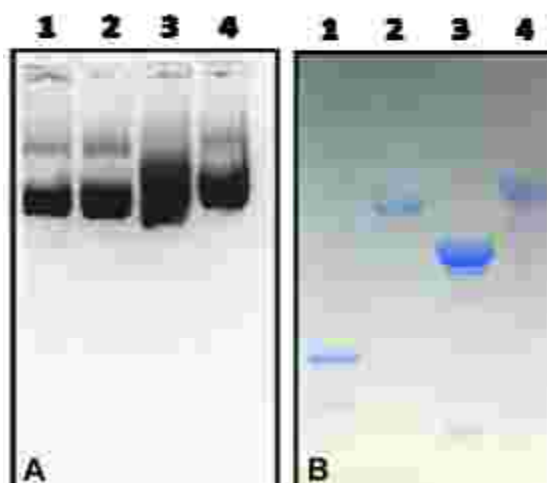


Figura 1. A. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed do DNA dos plasmídeos recombinantes utilizados como vacina de DNA. Coluna 1, pcDNA3/P37; coluna 2, pcDNA3/P42; coluna 3, pcDNA3/P46; coluna 4, pcDNA3/P95. B. Eletroforese em SDS-PAGE 12% corado com coomassie blue das quatro proteínas recombinantes purificadas por cromatografia de afinidade ao níquel, utilizadas como vacinas de subunidade recombinante. Coluna 1, P37 (20 kDa); coluna 2, P42 (42 kDa); coluna 3, P46 (35 kDa); coluna 4, P95 (41 kDa).

Segundo o teste de ELISA (Fig. 2), no dia 42 pós-imunização o soro dos animais imunizados com as vacinas recombinantes apresentaram anticorpos específicos contra todas as proteínas avaliadas. Esta resposta foi constante até o dia 84 pós-imunização. O soro dos animais inoculados com solução salina e com a bacterina comercial não reconheceram as proteínas recombinantes (dados não apresentados). As vacinas de subunidade recombinantes P42 e P95 apresentaram os melhores resultados de soroconversão aos 84 dias pós-imunização. Apenas a vacina de DNA pcDNA3/P46 induziu a produção de anticorpos IgG em camundongos, sendo esta resposta estatisticamente igual à observada nos animais inoculados com as vacinas de subunidade recombinantes P95 e P42 e superior à induzida pela vacina de subunidade recombinante P46.

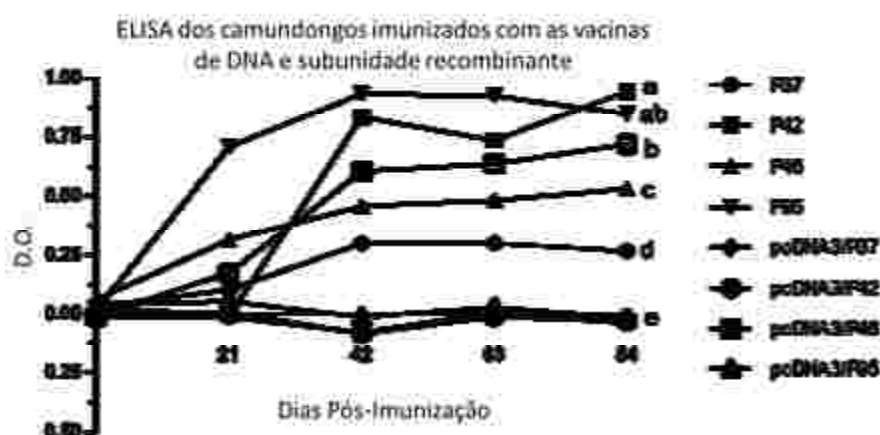


Figura 2. Média da densidade óptica obtida por ELISA indireto, utilizando soros de 8 de camundongos BALB/c (diluídos 1:50), imunizados com as vacinas P37, P42, P46, P95, pcDNA3/P37, pcDNA3/P42, pcDNA3/P46 e pcDNA3/P95. Os soros foram coletados nos dias 0, 21, 42, 63 e 84 pós-imunização. Anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (diluído 1:4000) foi utilizado como anticorpo secundário.

4 CONCLUSÃO

As vacinas de subunidade recombinantes P37, P42, P46 e P95, e a vacina de DNA pcDNA3/P46 foram capazes de induzir resposta imune humoral em camundongos, sugerindo o potencial destas como candidatas para compor uma nova vacina contra a Pneumonia Enzoótica Suína. Estas formulações serão avaliadas quanto ao potencial imunoprotetor no animal alvo deste estudo, os suínos.

5 REFERÊNCIAS

CHEN, Y. L.; WANG, S. N.; YANG, W. J.; CHEN, Y. J.; LIN, H. H.; SHIUAN, D. Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. **Infection and Immunity**, v.71, p.1155–1160, 2003.

GALLI, V. Resposta imune induzida por antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* avaliados como vacina de DNA ou subunidade recombinante. 2011. 105p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

ROSS, R. F.; LEMAN, A. D.; STRAW, B.; GLOCK, R. D.; MENGELING, W. L.; PENNY, R. H. C.; SCHOLL, E. Diseases of swine. **Mycoplasma Disease**, The Iowa State University Press, Ames, IA. p. 469–483, 1986

ROSS, R.F. Mycoplasmal diseases. In: STRAW, B.E. et al. **Diseases of Swine**. Iowa State University Press, Ames, Cap.36, p. 495–505, 1999.

SIMIONATTO S.; MARCHIORO, S. B; GALLI, V.; LUERCE, T. D.; HARTWIG, D. D.; MOREIRA, A.N.; DELLAGOSTIN, O. A. Efficient site-directed mutagenesis using an overlap extension-PCR method for expressing *Mycoplasma hyopneumoniae* genes in *Escherichia coli*. **J Microbiol Methods** 79:101-105, 2009.

SIMIONATO, S.; MARCHIORO, S. B.; GALLI V.; HARTWIG, D. D.; CARLESSI, R. M.; MUNARI, F. M.; LAURINO, J. P.; CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Cloning and purification of recombinant proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v.79, i.1, p.101-105, 2010.

STRAIT, E. L.; MADSEN, M. L.; MINION, F. C.; CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; DAMMEN, M.; JONES, K. R.; THACKER, E. L. Real-time PCR assays to address genetic diversity in *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.2491-2498, 2008.

THACKER, E. L.; HALBUR, P. G.; ROSS, R. F.; Thanawongnuwech, R. & Thacker, B. J. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.620–627, 1999.