

IMUNOGENICIDADE DE UMA QUIMERA RECOMBINANTE DE ANTÍGENOS DE *Mycoplasma hyopneumoniae* EM CAMUNDONGOS

FISCH, Andressa¹; MARCHIORO, Silvana B.¹; GALLI, Vanessa¹; GOMES, Charles K.¹; CONCEIÇÃO, Fabricio R.²

¹Laboratório de Biologia Molecular, ²Laboratório de Imunologia Aplicada, Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec, Universidade Federal de Pelotas, fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

1 INTRODUÇÃO

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente etiológico da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), doença respiratória contagiosa que acomete suínos em todo o mundo, causando grandes perdas econômicas à cadeia produtiva. Embora existam vacinas (bacterinas) amplamente utilizadas no controle desta doença, as mesmas apresentam um elevado custo de produção e eficiência limitada (ROSS, 1999). Em virtude disso, tornam-se relevantes os investimentos no desenvolvimento de alternativas para a profilaxia efetiva desta enfermidade. Potenciais antígenos estão sendo testados em diferentes sistemas de vacinação (CHEN *et al.*, 2003, SHIMOJI *et al.*, 2003; OKAMBA *et al.*, 2010), no entanto, também têm conferido apenas uma proteção parcial quando avaliados individualmente. A fusão de diferentes antígenos com capacidade protetora a uma unidade adjuvante em uma nova formulação vacinal pode melhorar a proteção dos animais. Este trabalho tem por objetivo avaliar a imunogenicidade da quimera recombinante rLTB-R1-P42-NrdF composta por três antígenos de *M. hyopneumoniae* (R1-P97, P42 e NrdF) fusionados à subunidade B da enterotoxina termolábil de *E. coli* recombinante (LTB), um potente adjuvante de imunidade de mucosa.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Clonagem, expressão e purificação da quimera

O gene sintético que codifica para a quimera foi clonado no vetor pAE, de expressão em *E. coli*, segundo FISCH *et al.* (2009). Os procedimentos de expressão e purificação desta proteína estão descritos em FISCH *et al.* (2010).

2.2 Imunização dos camundongos

Para avaliação da imunogenicidade da quimera, foram imunizados camundongos fêmeas BALB/c, com 6 a 8 semanas de idade, divididos em dois grupos de oito animais. O grupo controle foi inoculado com rLTB. Os camundongos do grupo teste receberam três doses da quimera, em uma concentração de 20 µg pela via intramuscular e com intervalo de 15 dias entre as doses. Amostras de sangue foram coletadas por punção do sino retro-orbital nos dias 0 (pré-imune), 15, 30 e 45. O soro foi processado e armazenado a -20°C.

2.3 Avaliação da resposta imune humoral

Para avaliar a produção de anticorpos induzida pela inoculação da quimera, foi realizado um ELISA indireto, no qual os soros dos animais inoculados foram confrontados separadamente contra cada uma das subunidades componentes da quimera, produzidas de forma recombinante segundo Simionatto *et al.* (2009). Microplacas de 96 cavidades foram sensibilizadas com rLTB, rR1, rP42 ou rNrdF dissolvidas em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6. Após incubação *overnight*, as placas foram lavadas com PBS-T e incubadas a 37 °C por 2 h com 200 µL de solução de bloqueio (leite desnatado 5%). Posteriormente, as placas foram lavadas

com PBS-T e incubadas com soro dos camundongos imunizados diluídos 1:100 em solução de bloqueio a 37 °C por 2 h. Após nova lavagem, as cavidades foram incubadas a 37 °C por 1 h com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase diluído 1:4000 em tampão de bloqueio. A reação colorimétrica foi gerada com a adição de *ortophenylenediamine dihydrochloride* e peróxido de hidrogênio. Após 15 minutos, 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 ELISA.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do ELISA (Fig. 1), verificou-se a produção estatisticamente significativa de anticorpos específicos contra cada subunidade componente da quimera, sendo que esta resposta foi mais pronunciada aos 45 dias pós-imunização. O grupo controle negativo, inoculado apenas com a proteína LTB, não apresentou anticorpos contra as demais proteínas.

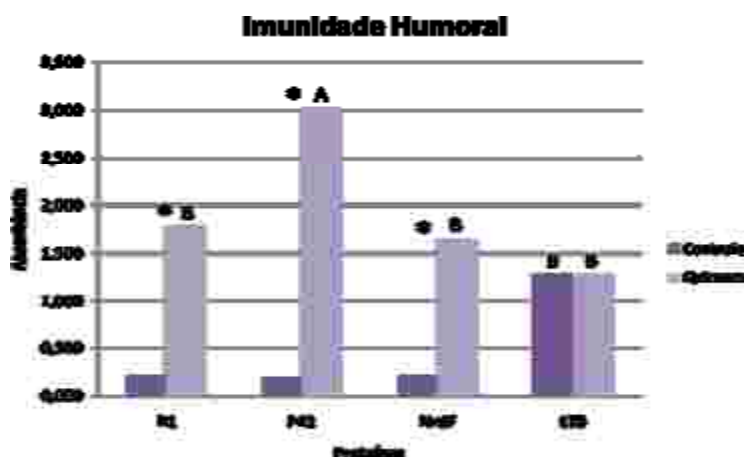


Figura 1 - Imunidade humoral induzida pela imunização com a quimera rLTB-R1-P42-NrdF. Os valores correspondem à D.O. média dos soros dos animais do grupo teste, confrontados com cada proteína individualmente. O asterisco indica diferença estatística em relação ao controle, em teste T a 1% de confiança, e letras diferentes indicam diferença estatística em análise ANOVA segundo teste Tukey a 1%.

A quimera é constituída por três antígenos de *M. hyopneumoniae* com alta capacidade imunogênica, já avaliados em estudos prévios, fusionados à LTB. A ocorrência de resposta imune contra as proteínas recombinantes, avaliadas de forma individual, indica que a quimera apresenta epítopos antigênicos originais aos presentes nas proteínas recombinantes, e que foram capazes de induzir a formação de anticorpos específicos, atestando assim a alta capacidade imunogênica deste novo antígeno.

Entre os antígenos, P42 apresentou níveis mais elevados de indução de anticorpos em comparação com os demais, embora todos tenham apresentado resposta superior ao soro pré-imune e sejam indicados por estudos anteriores como sendo potencialmente imunogênicos. A proteína P42 é uma proteína de choque térmico (heat shock protein - HSP), e tem sua expressão aumentada em situações de estresse para a célula bacteriana. As HSP apresentam capacidade de estimular o sistema imune inato através da interação com receptores celulares de superfície e de induzir a produção de moléculas pró-inflamatórias diversas. Também é descrita sua atuação na apresentação de antígenos para receptores CD8+ de células T, moléculas MHC e receptores do tipo *tool like* (STEWART e YOUNG, 2004). Estas

características conferem a esta proteína propriedades adjuvantes que podem aumentar a resposta imune contra os demais antígenos a ela associados em protocolos de imunização. É fortemente reconhecida por soros de suínos convalescentes por PES, o que indica sua elevada expressão nos processos de infecção e doença e sua alta capacidade imunogênica. Nesta construção, a proteína P42 representa a maior massa molecular da quimera, e conseqüentemente expõe um número maior de epítomos ao sistema imune quando comparada aos demais antígenos que compõem esta fusão. Este pode ser um dos motivos pelos quais pode-se observar a ocorrência de maior resposta imune contra esta proteína já a partir da primeira dose inoculada, bem como no dia 45. Chou *et al.* (1997) cita a capacidade de anticorpos monoespecíficos anti-P42 de limitar o desenvolvimento de *M. hyopneumoniae* em meio sólido, avaliado *in vitro* através de teste de inibição do crescimento (TIC), o que pode indicar grande importância no processo de desenvolvimento do microrganismo e, conseqüentemente, na ocorrência de processo patogênico durante a infecção..

A proteína P97 é a principal adesina expressa pelo *M. hyopneumoniae*. A região R1 desta proteína, utilizada na composição desta quimera, apresenta os sítios essenciais para a ligação do patógeno às células do trato respiratório. Experimentos anteriores demonstram que este fragmento induz a formação de anticorpos em suínos capazes de impedir a colonização das células do epitélio respiratório *in vitro* (OKAMBA *et al.*, 2010), sinalizando para uma possível capacidade protetora estimulada pela expressão deste antígeno. Da mesma forma, a proteína NrdF (subunidade R2 da ribonucleotídeo redutase) teve sua capacidade protetora em suínos avaliada anteriormente (FAGAN *et al.*, 1996), tendo sido capaz de diminuir o escore de lesão pulmonar para PES em suínos imunizados com esta proteína, em comparação com o grupo controle negativo. Ambos os antígenos apresentaram imunogenicidade significativa neste estudo, quando comparada a resposta imune dos animais no dia 0 e 45. Estudos posteriores são necessários para determinar se a ocorrência de anticorpos específicos contra estas proteínas fusionadas é capaz de diminuir a infecção por *M. hyopneumoniae in vivo*. Neste trabalho, apenas a proteína LTB foi utilizada como adjuvante, e a ocorrência de resposta imune positiva contra os antígenos da fusão indica sucesso neste ponto, no entanto estudos posteriores serão necessários para determinar efetivamente sua atividade adjuvante nesta construção, uma vez que o grupo controle negativo foi imunizado com esta proteína.

4 CONCLUSÃO

O investimento em técnicas moleculares para a produção de novas vacinas contra a PES pode ser decisivo para o desenvolvimento de produtos mais eficazes e de menor custo para a cadeia produtiva em comparação aos atualmente disponíveis. A expressão de antígenos associados permite incrementar a resposta imune induzida, em especial quando unidos a uma molécula adjuvante, por explorar na mesma oportunidade maior número de antígenos capazes de induzir a produção de anticorpos protetores. São necessários mais estudos acerca da capacidade protetora *in vivo* desta construção e de seus antígenos individuais.

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, n.3., p.1155-1160, 2003.

CHOU, S.Y.; CHUNG, T.L.; CHEN, R.J.; RO, L.H.; TSUI, P.I.; SHIUAN, D. Molecular cloning and analysis of a HSP (heat shock protein) like 42 kDa antigen gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Biochemistry and Molecular Biology International*, v.4, n.4, p.821-831, 1997.

FAGAN, P.K.; DJORDJEVIC, S.P.; EAMENS, G.J.; CHIN, J.; WALKER, M.J. Molecular Characterization of a Ribonucleotide Reductase (*nrdF*) Gene Fragment of *Mycoplasma hyopneumoniae* and Assessment of the Recombinant Product as an Experimental Vaccine for Enzootic Pneumonia. *Infection and Immunity*, v.64, n.3, p.1060-1064, 1996.

FISCH, A.; MARCHIORO, S.B.; GALLI, V.; SIMIONATTO, S.; GOMES, C.K.; DELLAGOSTIN, O.; CONCEIÇÃO, F.R. Design de um gene sintético para expressão de uma quimera de antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Anais do XVII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas*. Pelotas, Rio Grande do Sul. 2009.

FISCH, A.; MARCHIORO, S.B.; GOMES, C.K.; GALLI, V.; DELLAGOSTIN, O.A.; CONCEIÇÃO, F.R. Produção e caracterização de uma quimera de antígenos de *M. hyopneumoniae*. *Anais do XIX Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas*. Pelotas, Rio Grande do Sul. 2010.

OKAMBA, F.R., ARELLAA, M., MUSICB, N., JIA, J.J., GOTTSCHALKB, M., GAGNONB, C.A. Potential use of a recombinant replication-defective adenovirus vector carrying the C-terminal portion of the P97 adhesin protein as a vaccine against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine. *Vaccine*, v. 28, p. 4802-4809, 2010.

ROSS, R.F. Mycoplasmal diseases. In: STRAW B.E, D'ALLAIRE, S., MENGELING W.L., TAYLOR D.J. *Diseases of Swine*. Iowa State University Press, Ames, Cap.36, p.495–505, 1999.

SHIMOJI, Y., OISHI, E., MUNETA, Y., NOSAKA, H., MORI, Y. Vaccine efficacy of the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine. *Vaccine*, v. 21, p. 532–537, 2003.

SIMIONATTO, 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, 2009.

STEWART, G.R. e YOUNG, D.B. Heat-shock proteins and the host–pathogen interaction during bacterial infection. *Current Opinion in Immunology*, v.16, p.506-510, 2004.