

AValiação DA IMUNOGENEcIDADE DE PRoTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Mycoplasma hyopneumoniae* VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA DE SUBUNIDADE

IMMUNOGENECITY ASSESSMENT OF *Mycoplasma hyopneumoniae* RECOMBINANT PROTEINS FOR THE DEVELOPMENT OF SUBUNIT VACCINE

SIMIONATTO, S.¹; MARCHIORO, S.B.¹; GALLI, V.¹; PAGLIARINI, R.^{1*}; KLEIN, C. S.²; REBELATTO, R.²; DELLAGOSTIN, O.A.¹

INTRODUÇÃO

O *Mycoplasma hyopneumoniae* é o agente etiológico da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), uma doença respiratória responsável por grandes perdas econômicas (SOBESTIANSKY et al., 1999). A doença é caracterizada por uma tosse crônica não produtiva, retardo no crescimento e piora nas taxas de conversão alimentar (ROSS, 1999). As vacinas usadas no controle são bacterinas, no entanto não são capazes de impedir a infecção (HAESEBROUCK et al, 2004). Além disso, essas vacinas apresentam elevado custo de produção devido ao crescimento fastidioso do *M. hyopneumoniae in vitro* (KOBISCH e FRIIS, 1996). Desta forma, o desenvolvimento de alternativas para a profilaxia da PES é fundamental para a melhoria da sanidade dos suínos. Entretanto, o repertório de proteínas antigênicas caracterizadas e disponíveis para utilização ainda é bastante restrito, protegendo apenas parcialmente os animais (FAGAN et al., 2000; SHIMOJI et al., 2003). Os dados gerados com o seqüenciamento e a análise proteômica complementar de duas cepas de *M. hyopneumoniae* (VASCONCELOS et al., 2005), possibilitaram a identificação de seqüências codificadoras (CDS) de proteínas antigênicas e/ou envolvidas na patogenicidade deste patógeno. Estes antígenos podem ser expressos em sistemas heterólogos, purificados e avaliados quanto ao potencial para desenvolvimento de vacinas ou testes de imunodiagnóstico, sem a necessidade do cultivo do *M. hyopneumoniae in vitro* (CAPECCHI et al., 2004). *Escherichia coli* é o sistema de biosíntese de proteínas mais utilizado devido a sua praticidade e baixo custo (NUC e Nuc, 2006). Entretanto, a expressão de proteínas de *M. hyopneumoniae* em *E. coli* é dificultada uma vez que o código genético do *M. hyopneumoniae* possui o códon TGA codificando para o aminoácido triptofano enquanto que em *E. coli*, TGA é um códon de terminação. No entanto, a substituição na seqüência do DNA do códon TGA para TGG, o qual codifica para o aminoácido triptofano em *E. coli*, possibilita a expressão de proteínas de *M. hyopneumoniae* em sistemas heterólogos. Este trabalho teve por objetivo a identificação de antígenos potencialmente protetores de *M. hyopneumoniae*, os quais foram clonados em vetores de expressão em *E.*

¹ Laboratório de Biologia Molecular, CenBiot/UFPEL, Campus Capão do Leão, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, s_simionatto@yahoo.com.br

² Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPISA/EMBRAPA), Concórdia, SC

coli, as proteínas recombinantes foram purificadas e avaliadas em camundongos quanto a capacidade de induzir resposta imune humoral.

MATERIAL E MÉTODOS

Análise das CDS: As CDS da cepa 7448 de *M. hyopneumoniae* foram analisadas com o auxílio dos programas de bioinformática PFAM, SWISS-PROT, PROSITE, NNPREPDICT, VECTOR, buscando satisfazer características como: possível envolvimento das proteínas codificadas em aspectos relacionados à patogenicidade e/ou à antigenicidade, seqüências hidrofílicas com poucos ou nenhum códon de triptofano.

Clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae*: As seqüências das CDS selecionadas da cepa 7448 de *M. hyopneumoniae* foram amplificadas por PCR com Platinum® Pfx DNA Polymerase (Invitrogen). Os *primers* utilizados na amplificação foram desenhados a partir da seqüência da cepa 7448 depositada no GenBank, números de acesso NC_007332. As seqüências que continham códons TGA foram submetidas à mutagênese sítio-dirigida, com o auxílio da técnica de *PCR-overlapping* (HO et al., 1989). Estes genes foram amplificados em dois segmentos, tendo o *primer* reverso do primeiro segmento e o *forward* do segundo segmento a seqüência alterada de TGA para TGG. Estes dois segmentos possuem uma sobreposição de pelo menos 12 nucleotídeos o que permite, numa segunda PCR utilizando os dois segmentos amplificados, a extensão de todo o gene. Os fragmentos gerados nesta PCR, bem como os amplicons dos genes sem TGA, foram submetidos à clonagem direcional no vetor de expressão Champion pET200D/TOPO His-tag (Invitrogen). Os plasmídios recombinantes foram transformados na cepa de expressão *E. coli* BL21 RIL competente, cultivadas até a fase log de crescimento e induzidas por 3 h com 0,3 mM de IPTG (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). A purificação das proteínas recombinantes foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de sepharose (HisTrap™) carregada com níquel, usando o sistema ÄKTA-Prime (Amersham Biosciences). A pureza das mesmas foi determinada através SDS-PAGE e a concentração pelo Kit BCA™ Protein Assay (Pierce).

Inoculação de camundongos com as proteínas recombinantes e testes de antigenicidade: As proteínas purificadas foram inoculadas em camundongos BALB/c fêmeas com 7 semanas de vida. Foram administradas duas doses por via intramuscular (IM) com 50 µg de proteína, com intervalo de 21 dias. Foi utilizando 15% de hidróxido de alumínio como adjuvante. O título de anticorpos sistêmicos foi monitorado por *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) utilizando como antígeno as proteínas recombinantes. A média das absorbâncias (OD₄₅₀) do ELISA foi calculada com os soros analisados em triplicata. O ponto de corte foi determinado usando o soro pré-imune. Foi calculada a média dos valores de ELISA e o desvio padrão (S.D.) destes soros. O ponto de corte foi calculado com os valores das médias + 2 S.D. Os valores iguais ou superiores ao ponto de corte foram considerados positivos. O soro dos camundongos foi confrontado contra extrato de *M. hyopneumoniae* (cepas 7448) através de um Cell-ELISA. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t-Student's. Os resultados foram considerados positivos quando o P = 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sessenta e três alvos de expressão pertencentes a 48 diferentes CDS de *M. hyopneumoniae* foram selecionados para clonagem e expressão em *E. coli*. As CDS foram amplificadas e 59 destas foram clonadas no vetor Champion pET200D/TOPO. A metodologia adotada para a realização da mutação sítio-dirigida foi bem sucedida, uma vez que os 14 alvos selecionados e submetidos à mutação tiveram a substituição do códon TGA por TGG. Trinta e cinco proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade e 31 destas foram inoculadas em camundongos. O título de anticorpos sistêmicos induzidos por estas proteínas foi monitorado por ELISA. Os valores de absorvância do soro imune foram significativamente superiores ao pré-imune a partir do dia 42 pós-imunização e permaneceu até o dia 105, em todos os grupos de camundongos imunizados. O resultado obtido demonstrou que os antígenos induzem um título de anticorpos variado, o que nos permite inferir quanto à capacidade imunogênica de cada antígeno. A Figura 1 demonstra as 16 proteínas que induziram o título mais alto de anticorpos em camundongos. O soro destes animais também foi confrontado contra extrato de *M. hyopneumoniae* (cepa 7448) através de Cell-ELISA para avaliar se os anticorpos produzidos contra as proteínas recombinantes são capazes de reconhecer as proteínas nativas deste patógeno. O soro dos 31 grupos de camundongos reagiu contra as proteínas nativas do *M. hyopneumoniae* e destes, 20 grupos tiveram valores de absorvância diferentes estatisticamente ($P \leq 0,05$) quando comparados ao soro pré-imune (PI) e ao soro do grupo controle negativo (PBS) (Fig. 2). Estas proteínas recombinantes estão sendo confrontadas contra soro de suínos naturalmente infectados através das técnicas de ELISA e *Western blot*, com o objetivo de avaliar a antigenicidade destes antígenos.

Até o momento somente 8 proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* haviam sido purificadas e avaliadas quanto ao potencial antigênico e imunogênico (MAES et al., 2007). Neste trabalho nós descrevemos a produção e caracterização imunogênica de um grande número de novas proteínas recombinantes, as quais podem constituir novas estratégias para o controle da PES. Tendo em vista que os testes de desafio em suínos apresentam custo elevado, é importante a seleção prévia de antígenos candidatos a vacinas que, primeiramente, apresentem-se imunogênicos em animais de laboratório. Posteriormente, os antígenos que forem capazes de induzir uma resposta imune contra a PES poderão então ser avaliados no animal alvo deste estudo, os suínos.

CONCLUSÕES

A maioria das proteínas de *M. hyopneumoniae*, produzidas em *E. coli* e avaliadas neste estudo, induziram uma resposta imune humoral específica em camundongos. O soro destes animais reconheceu as proteínas nativas do *M. hyopneumoniae*. Os resultados deste trabalho representam um avanço na caracterização de proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* quanto à capacidade das mesmas induzirem uma resposta imune específica. Este trabalho irá contribuir para eleger os antígenos mais promissores, os quais serão utilizados em um ensaio de imunoproteção em suínos, visando à obtenção de uma vacina recombinante contra Pneumonia Enzoótica Suína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAPECCHI, B.; SERRUTO, D.; ADU-BOBIE, J.; RAPPUOLI, R.; PIZZA, M. The Genome Revolution in Vaccine Research. **Mol. Biol.**, 2004, 6, p.17-28.
- FAGAN, P.K; WALKER, M; CHIUN, J; EAMENS, G.J, DJORDJEVIC, S.P. Oral immunization of swine with attenuated *Salmonella typhimurium aroA* SL3261 expressing a recombinant antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* (NrdF) primes the immune system for a NrdF specific secretory IgA response in the lungs. **Microbial Pathogenesis**, 2000, 30, p.101-110.
- HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F.; CHIERS, K.; MAES, D.; DUCATELLE, R.; DECOSTERE, A. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? **Vet Microbiol**, 2004, 100, p.255–268.
- Ho S.N.; Hunt H.D.; Horton R.M.; Pullen J.K.; Pease L.R. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. **Gene**, 1989, 77, p.51–59.
- MAES, D.; SEGALES, J.; MEYNS, T.; SIBILA, M.; PIETERS, M.; HAESEBROUCK, F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs, **Vet. Microbiol.**, 2007, 126, p.297-309.
- Nuc, P.; Nuc, K. Recombinant protein production in Escherichia coli, **Postepy. Biochem.** 2006, 52, p. 448-56.
- ROSS, R.F. Mycoplasmal diseases. In: Diseases of Swine. 1999:495-510. Ed. 8º, Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SHIMOJI, Y.; OISHI, E.; MUNETA, Y.; NOSAKA, H.; MORI, Y. Vaccine efficacy of the attenuated *Erusipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinat protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine. **Vaccine**, 2003, 21, p.532-537.
- SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N.; et al. 1999. Pneumonia enzoótica. In: **Clínica e Patologia Suína**. 2ª ed., Art 3 Impresses Especiais, Goiânia, Goiás, p.359.
- VASCONCELOS, A.T.R.; FERREIRA, H.B.; BIZARRO, C.V.; et al. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. **Journal of Bacteriology**, 2005, 187, p. 5568-5577.

Figura 1.

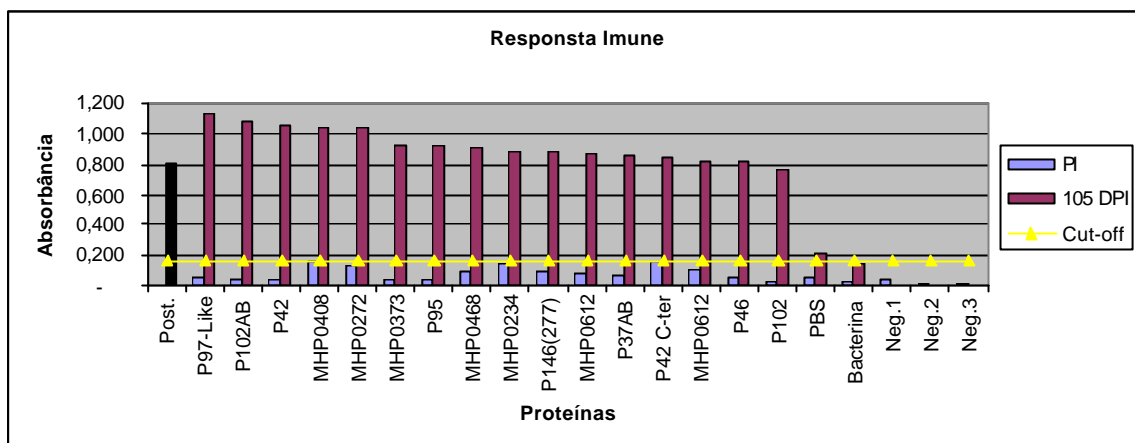


Fig. 1. Resposta imune humoral de camundongos imunizados com as proteínas recombinantes, determinado através de ELISA indireto. Dezesseis proteínas que induziram o mais alto título de anticorpos em camundongos. Anti-soro polivalente de camundongo conjugado com peroxidase (diluído 1:4000) foi usado como anticorpo secundário. PI, soro pré-imune; 105 DPI, soro imune 105 dias após a imunização; Negativo 1, 2 e 3 são os controles sem antígeno, sem soro e sem o conjugado polivalente anti-camundongo, respectivamente. O ponto de corte representa à média dos soros PI + 2 desvio padrão. Os valores iguais ou superiores ao ponto de corte foram considerados positivos. Os dados representam à média da (OD_{450}).

Figura 2.

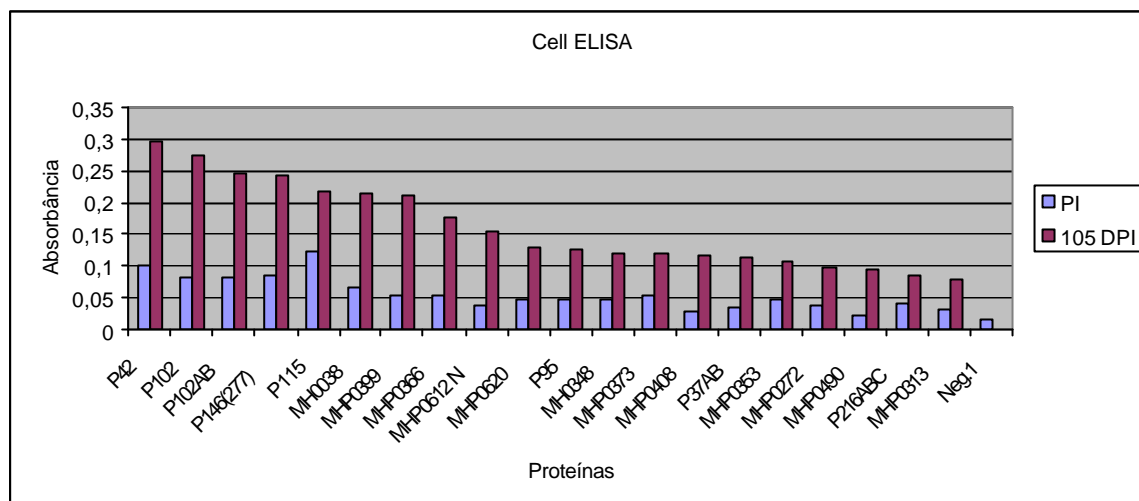


Fig. 2. ELISA usando extrato de *M. hyopneumoniae* como antígeno. Detecção de anticorpos no soro de camundongos imunizados com as proteínas recombinantes. Anti-soro polivalente de camundongo conjugado com peroxidase (diluído 1:4000) foi usado como anticorpo secundário. Os dados representam a média da OD₄₅₀ dos 20 grupos de camundongos com diferença estatística significativa, usando o teste t-Student's. PI, soro pré-imune; 105 DPI, soro imune 105 dias após a imunização; Negativo 1, o controle de placa sem antígeno. Os resultados foram considerados positivos quando o P = 0,05.