



## IMUNOGENICIDADE DE PROTEÍNAS TRANSMEMBRANA RECOMBINANTES DE *Mycoplasma hyopneumoniae*

**PAGLIARINI, Ronaldo Luís<sup>1</sup>; MARCHIORO, Silvana. B.<sup>1</sup>; SIMIONATTO, Simone.<sup>1</sup>; BRUM, Clarice<sup>1</sup>; GALLI, Vanessa<sup>1</sup>; DELLAGOSTIN, Odir Antonio<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de biologia Molecular- Centro de Biotecnologia- UFPel

Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900. [ronaldopagliarini@yahoo.com.br](mailto:ronaldopagliarini@yahoo.com.br)

### 1. INTRODUÇÃO

A Pneumonia Enzootica Suína (PES) é uma das principais enfermidades respiratórias que acomete suínos em todo o mundo. O *Mycoplasma hyopneumoniae*, agente etiológico da doença, destrói o principal mecanismo de imunidade inata do trato respiratório desses animais, o elevador mucociliar, levando ao seu imunocomprometimento e predispondo estes animais às infecções secundárias (Thacker et al., 1999). A doença é cosmopolita, com taxa de morbidade podendo variar de 40 a 60% para animais entre 4 a 6 meses de idade, e a mortalidade pode chegar a 5% quando a enfermidade está instalada no sistema de produção de suínos (Silva, et al., 2003). As perdas econômicas causadas pela enfermidade podem chegar a 20% sobre a conversão alimentar e até 30% sobre o ganho de peso dos animais (Sobestiansky, et al., 1999).

Os animais infectados por *M. hyopneumoniae* podem não apresentar sinais clínicos e apenas demonstrar retardo no crescimento e queda na conversão alimentar, caracterizada pela disparidade no tamanho dos animais de mesmo lote. Os sinais clínicos, quando presentes, caracterizam-se por uma tosse crônica não produtiva, principalmente em suínos em fase de crescimento e terminação (Sibila et al., 2008), a qual ocorre devido ao quadro de broncopneumonia catarral que geralmente cursa com complicações broncopulmonares purulentas (Sobestiansky et al., 1999). O diagnóstico da PES pode ser feito com base nos sinais clínicos, lesões macroscópicas e histopatológicas. Outras alternativas de diagnóstico são o ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) e PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Sibila, et al., 2008).

A profilaxia da doença compreende boas práticas de manejo, como realização de vazio sanitário, boas condições de alojamento e vacinação do rebanho. As vacinas disponíveis no mercado são compostas por bacterinas, as quais apresentam um elevado custo de produção (Ross, 1999) e conferem apenas uma proteção parcial, não impedindo o estabelecimento da infecção nem a presença de suínos portadores (Haesebrouck et al., 2004). Devido às limitações das vacinas comerciais no que se refere à proteção e custo de produção, várias pesquisas vêm sendo realizadas a fim de identificar e caracterizar novos antígenos que possam ser utilizados em formulações de vacinas (Chen et al., 2001, 2006, 2008). Este trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar seqüências codificadoras (CDS) de

proteínas transmembrana do *M. hyopneumoniae*, buscando o desenvolvimento de uma vacina de subunidade recombinante mais eficiente para o controle da PES.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Com o auxílio de programas de bioinformática (PFAM, SWISS-PROT, PROSITE, NNPREDEICT, Vector NTI 9.0) foram analisadas as CDS de proteínas transmembrana da cepa 7448 de *M. hyopneumoniae*, buscando atender as seguintes características: possível envolvimento das proteínas codificadas por estas CDS em aspectos relacionados à patogenicidade e/ou à antigenicidade, seqüências hidrofílicas contendo poucos ou nenhum códon TGA. Após análise e seleção das CDS, foram desenhados *primers* a partir da seqüência da cepa 7448 depositada no GenBank, números de acesso NC\_007332. Estes genes foram amplificados por PCR com Platinum® Pfx DNA Polymerase (Invitrogen). As seqüências que continham códons TGA foram submetidas à mutagênese sítio-dirigida, com o auxílio da técnica de *PCR-overlapping* (Simionatto et al., 2008). Os fragmentos dos genes que sofreram alteração sítio dirigida, 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 líquida de afinidade em coluna de sepharose (HisTrap™) carregada com níquel, usando o sistema ÄKTAPrime (GE Healthcare). A pureza das proteínas foi determinada através de SDS-PAGE e a concentração pelo Kit BCA™ Protein Assay (Pierce).

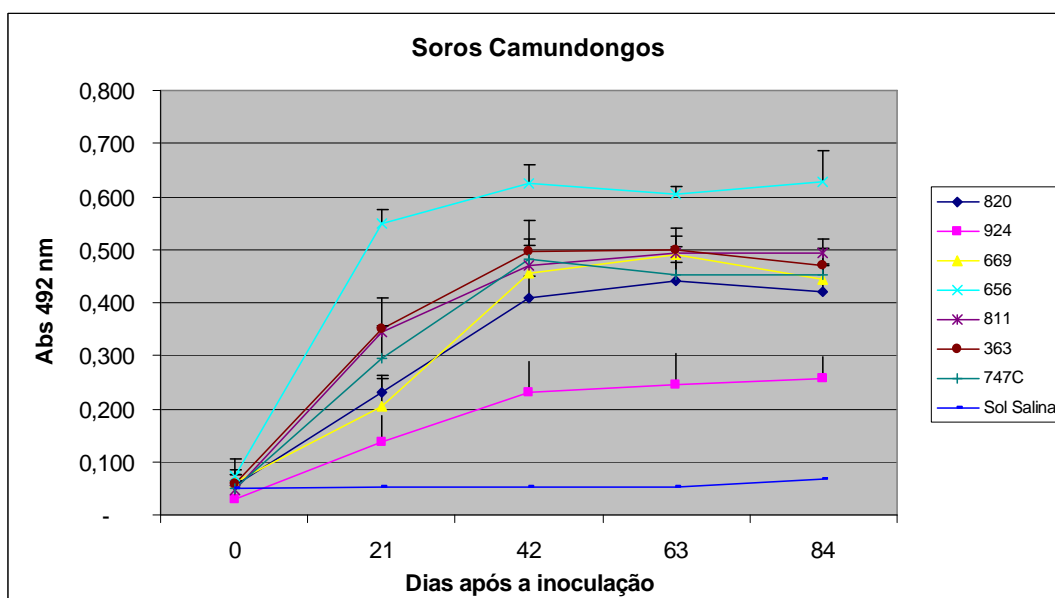
As proteínas purificadas foram inoculadas em 7 grupos de camundongos BALB/c contendo 5 animais cada, machos e fêmeas, separados de acordo com o sexo. Foram administradas duas doses, nos dias 0 e 21 após a primeira inoculação, por via intramuscular (IM) com 50 µg de proteína cada, acrescida com 15% de hidróxido de alumínio como adjuvante. Além das proteínas recombinantes, inoculou-se um grupo com solução salina 0,85% mais o adjuvante, atuando como controle negativo e um grupo com a bacterina comercial *RespiSure* (Pfizer®). O sangue dos animais foi coletado do plexo venoso retrocular nos dias 0, 21, 42, 63 e 84 após a primeira inoculação. O título de anticorpos sistêmicos foi monitorado por ELISA utilizando como antígeno as proteínas recombinantes. As condições utilizadas foram de 100 ng de proteína para a sensibilização das placas, diluição dos soros 1:50 e anti-soro polivalente de camundongo diluído 1:4000. A reação colorimétrica do ELISA foi desenvolvida com *o-phenylenediamine dihydrochloride* (Sigma) e peróxido de hidrogênio, após 15 min de incubação no escuro. A absorbância foi determinada a 450 nm com leitor de microplacas (Multiskan MCC/340, Titertek Instruments, Huntsville, AL). A média das absorbâncias (OD<sub>450</sub>) do ELISA foi calculada com os soros analisados em triplicata. Foi calculada a média dos valores de ELISA e o desvio padrão (S.D.) destes soros.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionados 19 CDS de proteínas transmembranas. As seqüências codificadoras correspondentes a estas CDS foram amplificados e 15 foram eficientemente clonados no vetor de expressão em *E. coli* pET200D/TOPO. Dos 15 genes clonados, 7 tiveram suas proteínas recombinantes expressas em *E. coli*, as quais foram purificadas por cromatografia líquida de afinidade. O título de anticorpos

sistêmicos induzidos pelas proteínas recombinantes foi determinado por ELISA indireto. Os valores das absorvâncias dos soros imunes foram superiores ao pré-imune já a partir do dia 21 pós-imunização apresentando um aumento mais significativo no dia 42 e permanecendo estável até o dia 84, em todos os grupos de camundongos imunizados. Observou-se que os antígenos selecionados possuem capacidade de induzir uma resposta imune específica em camundongos, quando comparados ao grupo controle.

Dentre todas as proteínas testadas, a 656 induziu o mais alto título de anticorpos. As demais proteínas, com exceção da proteína 924 que induziu a menor resposta imune, apresentaram valores de absorvâncias similares durante o experimento, o que indica uma resposta imune também similar entre estes antígenos. O gráfico da figura 1 demonstra a média de todas as proteínas testadas até o 84º dia após a inoculação, o desvio padrão de cada uma delas e a média do grupo controle negativo (solução salina).



**Figura 1:** Resposta imune humoral de camundongos imunizados com as proteínas recombinantes, determinado através de ELISA indireto. O soro dos camundongos foi utilizado na diluição de 1:50. O anti-soro polivalente de camundongo conjugado com peroxidase (diluído 1:4000) foi usado como anticorpo secundário. Os dados representam a média da ( $OD_{450}$ ).

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam a capacidade imunogênica destes antígenos recombinantes quando avaliados em camundongos. A resposta imune específica induzida por estas proteínas é promissora, sendo alvos potenciais para utilização em testes de desafio em suínos visando o desenvolvimento de vacinas recombinantes contra a PES.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHEN, J.R. et. Al., A recombinant chimera composed of repeat region RR1 of *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin with *Pseudomonas* exotoxin: in vivo evolution

of specific IgG response in mice and pigs. **Veterinary Microbiology**, 2001, v.80, p. 347-357.

CHEN AY, FRY SR, FORBES-FAULKNER J, DAGGARD GE, MUKKUR, TKS. Comparative immunogenicity of *M. hyopneumoniae* NrdF encoded in different expression systems delivered orally via attenuated *S. typhimurium* aroA in mice. **Vet Microbiol.** 2006, v114, p.252–259.

CHEN, A.Y., Fry, S.R., DAGGARD, G.E., MUKKUR, T.K.S. Evaluation of immune response to recombinant potential protective antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as cocktail DNA and/or recombinant protein vaccines in mice, *Vaccine*, 2008 doi:10.1016/j.vaccine.2008.06.005

DA SILVA, C. A. et al. Tilmicosine in rations of swines in growing and finishing phases Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, 2003 v. 24, n. 1, p. 113-118.

HAESEBROUCK, F., et al. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? **Veterinary Microbiology**, 2004, v. 100 p. 255-68.

ROSS, R.F., Mycoplasmal diseases. In: Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. (Eds.), *Diseases of Swine*. Iowa State University Press, Ames, 1999 p. 495–505.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001.

SIBILA, M., et al., Current perspectives on the diagnosis and epidemiology, **The Veterinary Journal** 2008, doi:10.1016/j.tvjl.2008.02.020.

SIMIONATTO, S., MARCHIORO, S.B., HARTWIG, D., GALLI, V., DINIS, T.L., MOREIRA, A.N. DELLAGOSTIN, O.A. Efficient site directed mutagenesis using an overlap extension-PCR method for cloning and expression of *Mycoplasma hyopneumoniae* genes in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2008, submetido.

SOBESTIANSKY, J. et al. Pneumonia enzoótica. In: **Clínica e patologia suína**. 2.ed. Goiânia, Goiás: Art 3 Impresses Especiais, 1999. p.359.

THACKER, E.; HALBUR, P.; ROSS, R.; THANAWONGNUWECK, R.; TRACKER, B. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus- induced pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology**, 1999, 37:620-627.