



ANTIGENICIDADE DE PROTEÍNAS SECRETADAS DE *M. hyopneumoniae*

**GALLI, Vanessa; SIMIONATTO, Simone; MARCHIORO, Silvana, B.;
DELLAGOSTIN, Odir, A.**

*Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Biotecnologia, Campus Capão do Leão,
Caixa Postal 354 – Pelotas/RS, CEP 96010-900. vane.galli@bol.com.br*

1. INTRODUÇÃO

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente etiológico primário da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), uma das doenças respiratórias mais comuns que acomete suínos no mundo todo. A doença é caracterizada por alta morbidade e baixa mortalidade, levando à baixa conversão alimentar e retardo no crescimento dos suínos em todas as idades, causando consideráveis perdas econômicas (Ross, 1986; Sobestiansky *et. al.*, 1999). Este agente coloniza o epitélio ciliado respiratório, comprometendo a sua integridade e tornando o animal suscetível a infecções secundárias e oportunistas (Thacker *et. al.*, 1999).

A PES pode ser controlada com o uso de antibióticos e procedimentos de manejo animal, no entanto, a vacinação é considerada a forma mais eficiente de controle desta infecção (Ross *et. al.*, 1986). Porém, a vacina atualmente utilizada, a qual consiste de células inteiras (bacterina), apresenta elevado custo de produção, não previne a colonização e não apresenta uma proteção satisfatória (Sobestiansky *et. al.*, 1999).

A investigação e o controle da doença também são dependentes de técnicas de diagnóstico apropriadas. Várias metodologias incluindo sinais clínicos e lesões, inspeção em abatedouros e testes laboratoriais como ELISA, PCR e imunofluorescência são utilizadas para monitorar infecções por *M. hyopneumoniae*, no entanto, apresentam limitações (Sibila *et al.*, 2008; Thacker, 2004). O isolamento através de técnicas bacteriológicas é considerado o “padrão ouro” das técnicas de diagnóstico, mas o crescimento lento deste agente e a interferência com outros micoplasmas suínos tornam esta metodologia difícil (Sibila *et al.*, 2008).

Desta forma, este trabalho teve por objetivo a avaliação da antigenicidade de proteínas de *M. hyopneumoniae*, buscando contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas no controle da PES.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produção das proteínas recombinantes: Três genes (MHP0418, MHP0107, MHP0660) de *M. hyopneumoniae* foram clonados e expressos em

E. coli BL21DE3 Codon Plus RIL e as proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose (HisTrap™) carregada com níquel, usando o sistema automatizado de purificação ÄKTAPrime (GE Healthcare). A pureza das mesmas foi verificada em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), a concentração determinada pelo kit BCA™ Protein Assay (Pierce) e a identidade confirmada em *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-histidina.

2.3 Avaliação da antigenicidade das proteínas recombinantes

Para avaliar a antigenicidade das proteínas de *M. hyopneumoniae* expressas em *E. coli*, foi realizado *Western blot* usando soro de suíno imunizado com células inteiras inativadas de *M. hyopneumoniae* 7448, soro de suínos convalescentes e soros de suínos livres de patógenos específicos (SPF). Para tanto, 2 µg das proteínas recombinantes foram submetidas à SDS-PAGE 12% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante (Mini transblotter, Bio-Rad). As membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% (tampão de bloqueio) a 4 °C por 2 h. Após serem lavadas em PBS-T (3 × 5 min) foram incubadas a 37 °C por 2 h, com os soros de suínos (1:100 em tampão de bloqueio) previamente adsorvidos em extrato de *E. coli*, visando diminuir reações inespecíficas contra antígenos de *E. coli*. Foram testados dois *pools* de cinco soros de suínos naturalmente infectados com necrópsia positiva para a PES, um *pool* com dois soros de suíno SPF e um *pool* com três soros hiperimunes de suínos (previamente imunizado com *M. hyopneumoniae* cepa patogênica 7448). Após lavagem com PBS-T (3 × 5 min cada lavagem), foi adicionado o anti-soro IgG de suíno conjugado com peroxidase (diluído 1:2000 em tampão de bloqueio), incubado a 37 °C por 1 h. As bandas das proteínas imunoreativas foram detectadas com DAB, Tris-HCl 50 mM e NiSO₄ 0,3%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação e caracterização de proteínas antigênicas é um passo importante não apenas para o entendimento dos mecanismos de patogenicidade de *M. hyopneumoniae*, mas também para a seleção de antígenos promissores para o desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos para o controle da PES. Desta forma, três proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* foram expressas em *E. coli* BL21DE3 Codon Plus RIL, purificadas por cromatografia de afinidade ao níquel e avaliadas quanto ao reconhecimento por anticorpos produzidos durante a infecção natural, através da técnica de *Western blot*.

Neste trabalho, todas as proteínas recombinantes foram reconhecidas especificadamente quando confrontadas com os soros de suínos convalescentes e imunizados. A proteína hipotética MHP0660 foi mais reativa quando confrontada com soro de suínos convalescentes ao passo que a proteína MHP418 mostrou-se mais reativa quando confrontada com soro de suínos previamente imunizados com a cepa 7448 de *M. hyopneumoniae*. Esta diferença na reatividade pode ocorrer devido à alteração da expressão de algumas proteínas de *M. hyopneumoniae*, oriunda do cultivo *in vitro*, causando, por conseqüência, diferenças na produção de anticorpos em animais naturalmente infectados de animais experimentalmente infectados. Além disso,

na técnica de *Western blot*, as proteínas recombinantes são desnaturadas. Esta condição pode impedir a exposição de epitopos conformacionais, causando uma intensidade de reatividade muitas vezes errônea. Dessa forma, técnicas onde estas proteínas permaneçam na sua conformação íntegra são recomendadas para reforçar os resultados. Além disso, neste trabalho foram produzidas proteínas recombinantes que correspondem a apenas uma parte da proteína nativa. Portanto, há a possibilidade de a porção antigênica da proteína não ter sido selecionada.

A Figura 1 demonstra o resultado obtido no *Western blot* das três proteínas recombinantes confrontadas com soros de suínos. Uma banda de aproximadamente 80 kDa da cepa 7448 de *M. hyopneumoniae* reage visivelmente quando confrontada com soro de suínos convalescentes (Figura 1A), ao passo que esta reação é menos intensificada quando a mesma cepa é confrontada com soro hiperimune de suíno (Figura 1B). Este resultado dá suporte à sugestão de que há indução diferenciada de anticorpos quando os animais são experimentalmente ou naturalmente infectados. Um trabalho semelhante a este avaliou a antigenicidade de duas proteínas recombinantes (MHP651 e MHP378), as quais também foram reconhecidas especificadamente por anticorpos presentes no soro de suínos convalescentes (Meens *et al.*, 2006).

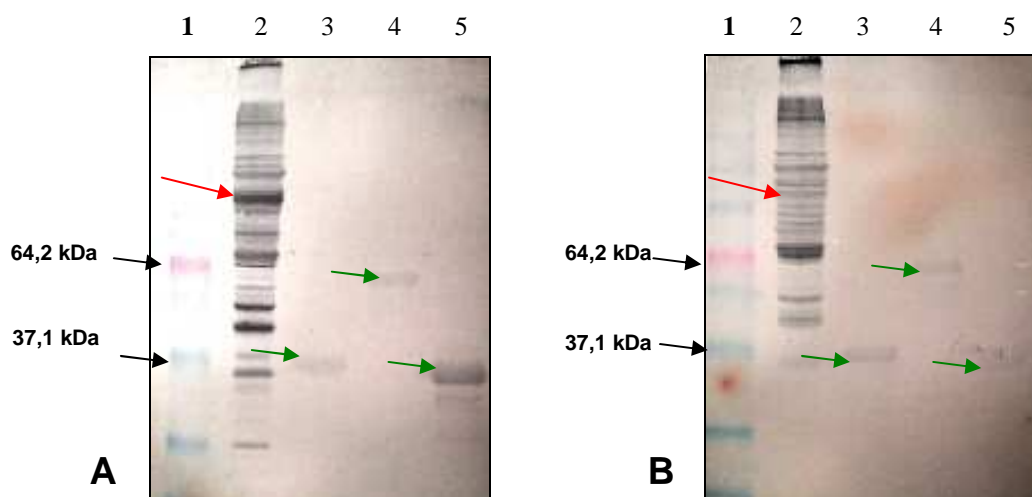


Figura 1. *Western blot* das três proteínas recombinantes separadas em 12% SDS-PAGE, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e confrontadas com: **A.** soro de suíno convalescente (diluído 1:100) e **B.** soro de suíno hiperimune (diluído 1:100). Anti-soro IgG de suíno conjugado com peroxidase (diluído 1:2000) foi utilizado como anticorpo secundário. Coluna 1, Marcador pré-corado; Coluna 2, extrato de *M. hyopneumoniae* cepa 7448; Coluna 3, MHP0418 (38 kDa); Coluna 4, MHP0107 (59 kDa); Coluna 5, MHP0660 (37 kDa). As setas verdes indicam as bandas imunoreativas. As setas vermelhas indicam uma banda de aproximadamente 80 kDa do extrato da cepa 7448 de *M. hyopneumoniae* que reagiu diferencialmente quando confrontada com soro de suínos convalescente e com soro hiperimune de suíno.

Os antígenos recombinantes purificados estão sendo utilizados na inoculação de camundongos BALB/c fêmeas. O título de anticorpos sistêmicos será monitorado por ELISA utilizando como antígeno as proteínas recombinantes. O soro dos camundongos será confrontado contra extratos de *M. hyopneumoniae* através da técnica de *Western blot* para avaliar a capacidade das mesmas em induzir uma resposta imune humoral que reconheça as proteínas nativas. As proteínas também serão avaliadas quanto

ao reconhecimento por anticorpos produzidos durante a infecção natural, através das técnicas de *dot blot* e *Western blot*.

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível caracterizar antígenicamente três proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae*. As proteínas reconhecidas por anticorpos presentes no soro de suínos naturalmente infectados indicam que as mesmas são expressas durante a infecção pelo *M. hyopneumoniae* e, portanto, serão testadas quanto a sua imunogenicidade a fim de selecionar os antígenos mais promissores para a utilização em um teste de imunodiagnóstico e para o desenvolvimento de uma vacina contra a PES.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MEENS,V; SELKE,V; GERLACH, G-F. Identification and immunological characterization of conserved *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoproteins Mhp378 and Mhp651. **Vet. Microbiol.**, v.116, p. 85–95, 2006.
2. 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, 1986, p. 469–483.
3. SIBILA, M.; BERNAL, R.; TORRENTS, D.; RIERA, P.; LLOPART, D.; CALSAMIGLIA, M.; SEGALÉS, J. Effect of sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on sow and piglet colonization and seroconversion, and pig lung lesions at slaughter. **Veterinary Microbiology**, v.127, p.165-170, 2008.
4. SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N. **Pneumonia enzoótica**. Clínica e Patologia Suína, 2ª ed., Art 3 Impressos Especiais, Goiânia, Goiás, 1999, p.359.
5. 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. **J Clin Microbiol**, 1999, v.37, p.620–627.
6. THACKER,E. L. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*, **Anim. Health Res**, 2004.