

VACINAS DE DNA CONTRA A PNEUMONIA ENZOÓTICA SUÍNA

GALLI, Vanessa¹; SIMIONATTO, Simone¹; MARCHIORO, Silvana¹; MENDONÇA, Marcelo¹; FISH, Andressa¹; KLAZER, Charles¹; CONCEIÇÃO, Fabrício¹; DELLAGOSTIN, Odir Antônio¹

Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Biotecnologia, UFPel - Email:vane.galli@bol.com.br

1 INTRODUÇÃO

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente etiológico da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), uma das doenças respiratórias mais frequentes na criação de suínos no mundo (SOBESTIANSKY et al., 1999). A vacina disponível comercialmente consiste de células inteiras inativadas (bacterina), as quais proporcionam apenas uma proteção parcial e não previnem a colonização do organismo (THACKER et al., 2000).

Neste contexto, faz-se necessária a busca de novas alternativas para a profilaxia da PES. Apesar de não terem sido elucidados completamente os mecanismos de patogênese do *M. hyopneumoniae*, trabalhos tem sugerido que a resposta imune celular e a mediada por anticorpos de mucosa são de fundamental importância para o controle desta doença (THACKER et al., 2000). Assim, vacinas baseadas em formulações de DNA constituem uma estratégia promissora por mimetizarem uma infecção natural, uma vez que induzem a expressão destes antígenos *in vivo* (BABIUK, 2002), permitindo que os peptídeos antigênicos sejam apresentados ao sistema imune via MHC classe I e II, primando não apenas pela resposta imune mediada por células TCD4+, mas também por células TCD8+ (BABIUK, 2002).

Esta estratégia vacinal não apresenta os problemas associados à produção de proteínas recombinantes, como conformação imprópria da proteína ou altos custos no processo de purificação, não apresenta os possíveis riscos associados a vacinas atenuadas ou inativadas que usam organismos infecciosos, são fáceis de preparar e manipular e são estáveis à temperatura ambiente (DHAMA, 2008). Além disso, o vetor de expressão pcDNA3, comumente utilizado em vacinas de DNA, apresenta função adjuvante pois foi capaz de induzir a expressão de INF α em suínos, o qual está relacionado com a produção de imunidade inata precoce, bem como com a geração e manutenção da resposta imune específica (JOHANSSON et al., 2002). Desta forma, neste estudo foram produzidas vacinas de DNA contra a Pneumonia Enzoótica Suína e avaliada a capacidade destas vacinas de expressar o antígeno vacinal *in vitro* para posterior avaliação da imunogenicidade *in vivo*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção dos antígenos e amplificação dos fragmentos gênicos

As CDS da cepa 7448 de *M. hyopneumoniae* (GenBank acesso NC_007332) foram analisadas com o auxílio de programas de bioinformática (PFAM, SWISS-PROT, PROSITE, NNAPREDICT, VECTOR NTI 10), buscando proteínas codificadas em aspectos relacionados à patogenicidade e/ou à antigenicidade. Baseados nestes resultados e em trabalhos previamente desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa (SIMIONATTO, 2009), foram selecionados os antígenos P37 (MHP0360) e P95 (MHP0099). Os *primers* utilizados foram desenhados com o auxílio do software

Vector NTI 10 (Invitrogen[®]). Para realização da clonagem nos vetores, um sítio de restrição foi adicionado em cada *primer* (Tabela 1). As CDs de *M. hyopneumoniae* foram amplificadas por PCR a partir do DNA cromossomal com o auxílio da enzima *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen[®]). Foi realizada uma mutação sítio dirigida na CDS MHP0246 visando adaptação da sequência ao código genético universal, conforme Simionatto et al (2009). O produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e purificado utilizando GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, de acordo com as instruções do fabricante (GE Helthcare[®]).

Tabela 1. CDS de *M. hyopneumoniae* selecionados e os respectivos *primers* e enzimas de restrição utilizados para clonagem e mutação sítio-dirigida.

CDs	Primer	Enzimas de restrição
MHP0360 For	5'CGCGGGATCCAAAAAATGGACTGGGAAAAA3'	<i>Bam</i> HI
MHP0360 Rev	5'CGGAATTCTTAGTTAGATTCTGCATAAATCC3'	<i>Eco</i> RI
MHP0360 FM	5'CATTGCTTgACTGAAAGCAA3'*	
MHP0360 RM	5'GCTTTCAGTcCAAGCAAATGAA3'*	
MHP0099 For	5'CGCGGGATCCGAAGCATGGGTCCTTTTTTTG3'	<i>Bam</i> HI
MHP0099 Rev	5'CCGGAATTCTCAAAGTTTAAAAATCTCAGTTTCTT3'	<i>Eco</i> RI

**Primers* internos desenhados para realizar a mutação sítio-dirigida da CDS MHP7448_0360; nucleotídeos mutados aparecem em negrito e minúscula; nucleotídeos sublinhados representam o sítio de restrição da enzima.

2.2 Clonagem dos fragmentos gênicos

Os fragmentos gerados na PCR foram submetidos à clonagem no vetor de expressão pcDNA3, utilizando T4 DNA ligase (Invitrogen[®]). O produto da ligação foi transformado por eletroporação em *Escherichia coli* TOP10. A triagem dos clones recombinantes foi realizada através da técnica microprep (JOUGLARD et al., 2002).

Os plasmídios recombinantes foram expandidos em caldo Luria-Bertani (LB, Difco[®]) suplementado com ampicilina, seguido de uma extração de DNA plasmidial e caracterização enzimática dos plasmídios recombinantes. Estes plasmídeos, denominados pCDNA3/P37 e pCDNA3/P95 foram extraídos em larga escala utilizando o kit NucleoBond Xtra Midi/Maxi Nucleic Acid Purification (Macherey-Nagel).

2.3 Transfecção *in vitro* de células Vero

A fim de verificar a expressão das proteínas *in vitro* em células eucariotas, antes da imunização de camundongos, células Vero (células epiteliais de rim de macaco *Cercopithecus aethiops*) foram cultivadas com meio DMEM sem antibióticos e suplementado com 10 % de soro bovino fetal, em lamínulas fixadas em placas de poliestireno de 6 cavidades. Após 24 h, quando a confluência celular alcançava aproximadamente 90 %, estas células foram transfectadas com 10 µg dos vetores recombinantes pCDNA3/P37 e pCDNA3/P95, ou com vetor pCDNA3 não recombinante (controle negativo), utilizando lipofectamine[™]2000, conforme instruções do fabricante (Invitrogen[®]). Após 48 h de incubação, a expressão das proteínas foi avaliada por imunofluorescência e por RT-PCR semi-quantitativa. Para a imunofluorescência, as células fixadas com metanol absoluto e incubadas por 1 h a 37° C com soro policlonal de camundongo (1:100 em PBS 1X) previamente produzido contra as proteínas recombinantes correspondentes a cada vetor recombinante. As células foram incubadas com anticorpo policlonal anti-mouse IgM + IgG + IgA conjugado com Fitc (Millipore[®])(1:200 em PBS 1X) durante 1 h a 37° C em câmara úmida. As células então foram coradas com Hoestch (Sigma) em câmara úmida a 37° C por 40 min e visualizadas em microscópio de fluorescência.

Para realização do RT-PCR, o RNA total das células transfectadas foi extraído utilizando Trizol® Reagent (Invitrogen®), digerido com DNase (Invitrogen®) e o cDNA sintetizado utilizando a enzima M-MLV, conforme fabricante (Invitrogen®). A PCR semiquantitativa foi realizada com os *primers* desenhados conforme tabela 1. O produto da PCR corado com *gel red* foi verificado em gel de agarose 1%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Vacinas baseadas em formulação de DNA representam uma estratégia vacinal relativamente nova e promissora por proporcionar à indução de ambas as respostas imune, humoral e celular. Por isso, neste estudo produzimos duas vacinas de DNA utilizando antígenos previamente relatados como imunogênicos na forma de vacinas recombinantes de subunidade (SIMIONATTO, 2009).

Os fragmentos gênicos correspondentes às proteínas P37 (525 pb) e P95 (1065 pb) foram amplificados por PCR (Figura 1A), apresentando o tamanho esperado, e clonados no vetor pcDNA3 (Figura 1B), dando origem aos vetores recombinantes pcDNA3/P37 e pcDNA3/P95 (Figura 2), os quais foram caracterizados enzimaticamente e confirmada a presença do inserto.

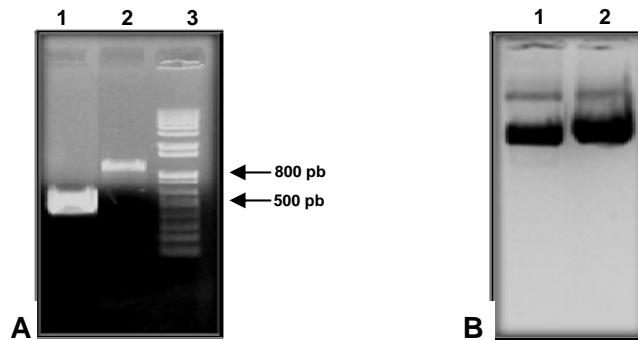


Figura 1. A) Gel de agarose 1% confirmando a amplificação das CDSs. 1- MHP0360, 2- MHP0099, 3- marcador de peso molecular 1kb plus. **B)** Gel de agarose 0,8% demonstrando a extração dos vetores recombinantes. 1- pcDNA3/P37, 2- pcDNA3/P95.

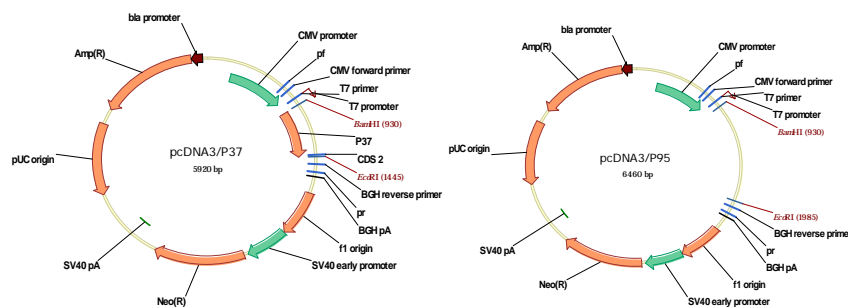


Figura 2. Esquema gerado no programa Vector NTI 11, representando com vetores recombinantes gerados neste estudo.

Para investigar e assegurar que os genes que codificam para as proteínas P37 e P95 podem de fato ser transcritos em células de mamíferos, utilizando as vacinas desenvolvidas, a presença de mRNAs específicos destes genes foi verificada por RT-PCR, a partir do RNA total isolado de células Vero transfectadas com os vetores recombinantes. Como mostra a figura 2A, um produto amplificado de aproximadamente 1065 pb, foi verificado em células transfectadas com o pcDNA3/P95. A transcrição da CDS MHP0360, porém, não foi observada em células transfectadas com o vetor pcDNA3/P37. Inusitadamente, quando avaliados por

imunofluorescência (Figura 2B), apenas a proteína P37 foi reconhecida pelos anticorpos policlonais utilizados, indicando que foi expressa *in vitro*. Possivelmente a expressão da proteína P95 não foi alta suficiente, ou foi transiente, dificultando sua detecção.

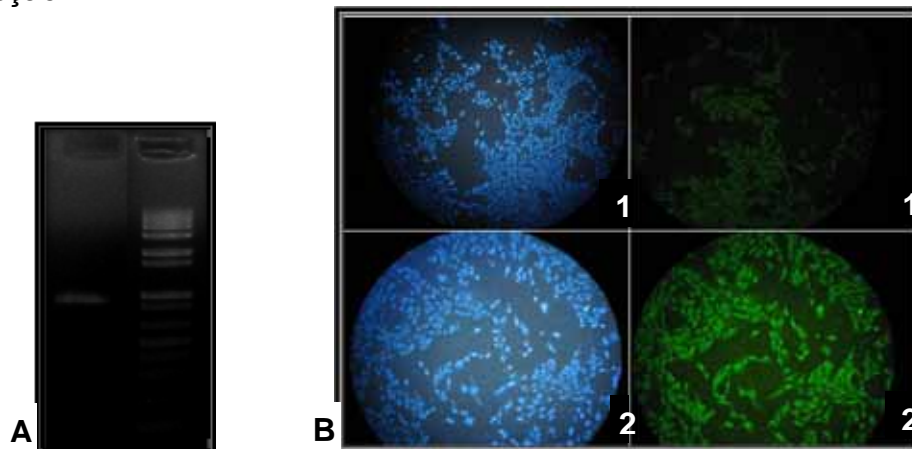


Figura 2. A) Gel de agarose 1% evidenciando: 1- amplificação por RT-PCR da CDS MHP0099; 2- ausência de amplificação da CDS MHP0246. **B)** Imunofluorescência de células transfectadas com: 1- pcDNA3 não recombinante (Controle negativo) e 2- pcDNA3/P95. Células em azul estão coradas com Hoestch; células em verde estão coradas com FITC.

4 CONCLUSÕES

As vacinas de DNA pcDNA3/P37 e pcDNA3/P95, desenvolvidas neste estudo, apresentam capacidade de expressar os antígenos em células de mamíferos.

5 REFERÊNCIAS

- JOUGLARD, S. D.; MEDEIROS, M. A.; VAZ, E. K.; BASTOS, R. G.; CUNHA, C. W.; ARMOA, G. R. G.; DELLAGOSTIN, O. A. An Ultra-Rapid and Inexpensive Plasmid Preparation Method for Screening Recombinant Colonies. **Abstracts American Society for Microbiology**, v.71, p.234, 2002.
- BABIUK, L. A. Vaccination: A Management Tool in Veterinary Medicine. **The Veterinary Journal**, v.164, p,188-201, 2002.
- DHAMA, K.; MAHENDRAN, M.; GUPTA, P. K.; RAI, R. DNA vaccines and their applications in veterinary practice: current perspectives. **Vet. Res. Commun.**, v.32, p.341-356, 2008.
- JOHANSSON, E., WALLGREN, P., FUXLER, L., DOMEIKA, K.; LEFÈVRE, F.; FOSSUM, C. The DNA vaccine vector pcDNA3 induces IFN- α production in pigs. **Veterinary Immunopathology**, v.87, i.1-2, p.29-40, 2002.
- SIMIONATTO, S. Produção e caracterização de proteínas recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae* com potencial para uso em imunodiagnóstico e vacinação. 2008. 125 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2008.
- SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N.; et al. Pneumonia enzoótica. In: **Clínica e Patologia Suína**. 2ª ed., Art 3 Impressos Especiais, Goiânia, Goiás, p.359, 1999.
- THACKER, EL; THACKER, BJ; KUHN, M; HAWKINS, PA; WATERS, WR. Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. **Am J Vet Res.**, v.61, p.1384–1389, 2000.