

AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE FUSÕES DE ANTÍGENOS DE *Mycoplasma hyopneumoniae* COM A SUBUNIDADE B DA ENTEROTOXINA TERMOLÁBIL DE *Escherichia coli* (LTB)

GOMES, Charles Klazer¹; MARCHIORO, Silvana Beutinger.¹; GALLI, Vanessa¹; FISCH, Andressa¹; CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo²; DELLAGOSTIN, Odir Antônio¹.

¹Laboratório de Biologia Molecular; ²Laboratório de Imunologia Aplicada – Centro de Biotecnologia/UFPel, Campus Capão do Leão, Caixa Postal 354 – Pelotas – RS, CEP 96010-900.
charlesklazer@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O *Mycoplasma hyopneumoniae* é o agente etiológico da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), uma doença respiratória contagiosa que acomete suínos no mundo todo, causando grandes perdas econômicas ao setor suinícola. Embora existam vacinas comerciais (bacterinas) usadas no controle desta doença, as mesmas não são produzidas no Brasil e apresentam um elevado custo de produção (ROSS, 1999). Em virtude disso, torna-se cada vez mais relevante e necessária a produção de insumos para o controle mais efetivo desta enfermidade. Entretanto, o repertório de proteínas antigênicas caracterizadas e disponíveis para utilização em testes vacinais ainda é bastante restrito (LIN et al., 2003; CHENN et al., 2008; SIBILA et al., 2009). Potenciais antígenos estão sendo testados em diferentes sistemas de vacinação, no entanto, também têm conferido apenas uma proteção parcial quando avaliados individualmente. A fusão e/ou co-administração de alguns destes antígenos pode ser uma alternativa para incrementar o controle da PES, em especial quando fusionados a um adjuvante.

Apesar do grande avanço tecnológico da vacinologia nas últimas décadas, proteínas solúveis, antígenos purificados e de baixa massa molecular podem ser pouco imunogênicos, necessitando a associação com substâncias adjuvantes (LECLERC, 2003). Várias substâncias vêm sendo testadas quanto a sua capacidade de gerar uma resposta imune mais expressiva, dentre as quais podemos citar as emulsões oleosas, sais inorgânicos, citocinas e derivados bacterianos, como a subunidade B da enterotoxina termolábil de *E. coli* (LTB) (BREWER, 2006; CONCEIÇÃO et al., 2006). Esta subunidade B é um potente adjuvante de mucosa ou parenteral, estimulando uma forte resposta imunológica contra antígenos co-administrados ou fusionados (SIMMONS et al., 2001).

Este trabalho teve por objetivo purificar e avaliar a resposta imune das proteínas R1 (P97), P42, de *M. hyopneumoniae*, co-administradas e fusionadas a LTB, além de comparar a ação adjuvante destas fusões com o adjuvante incompleto de Freund, buscando dessa forma o desenvolvimento de insumos mais eficientes para o controle da PES.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes e das fusões

As sequências dos genes que codificam para as proteínas R1 (P97) e P42 foram selecionadas, desenhados *primers* e amplificadas por PCR. Os fragmentos gerados nas ampliações foram clonados no vetor pAE e em fase com o gene *ltb* neste

mesmo vetor, gerando as fusões *ltb-p42* e *ltb-r1*. Os clones recombinantes foram transformados por choque térmico em cepas de expressão *E. coli* BL21 DE₃, cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) até a fase log de crescimento e induzidas por 3 h com 0,3 mM de *Isopropylβ-D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG). A purificação das proteínas recombinantes foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de sepharose (HisTrap™) carregada com níquel. A pureza das mesmas foi determinada através de SDS-PAGE 15 %, e a concentração determinada pelo kit BCA™ Protein Assay (Pierce).

2.2 Imunização dos camundongos

Para o experimento foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c, com 6 a 8 semanas de idade, foram divididas em cinco grupos de 08 animais. Os grupos vacinais foram: 1), rLTB-R1; 2) rLTB-P42; 3) rLTB-R1 + rLTB-P42; 4) rR1 + rP42 com a adição de adjuvante incompleto de Freund; 5) rR1 + rP42. Os camundongos receberam três doses de 20 µg por via I.M. nos dias 0, 15 e 30 após a primeira imunização. Amostras de sangue foram coletadas, com intervalo de 15 dias, através de punção do plexo venoso retrocular nos dias 0, 15, 30 e 45. O soro foi processado e armazenado a -20 °C.

2.3 ELISAS

O título de anticorpos contra os antígenos R1 e P42 foi determinado através de ELISA. Placas de poliestireno (Cral) foram sensibilizadas com 100 ng e 10 ng das proteínas, R1 e P42 respectivamente, diluídas em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6). Após incubação *overnight* à 4 °C, as placas foram lavadas três vezes com solução fosfato salina contendo 0,05 % (v/v) de Tween 20 (PBS-T), e incubadas com 200 µL de solução de bloqueio (PBS com 5 % de leite em pó) a 37 °C por 2 h. Após lavagens com PBS-T, as placas foram incubadas a 37 °C por 2 h com os soros dos camundongos (diluídos 1:100 em solução de bloqueio). Após três lavagens com PBS-T, as placas foram incubadas a 37 °C por 1 h com soro anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (diluído 1:6000 em solução de bloqueio). As reações colorimétricas foram desenvolvidas com o-*phenylenediaminedihydrochloride* (Sigma) e a leitura realizada em espectrofotômetro para microplacas (Thermo Plate) com filtro de 450nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação e caracterização de novos adjuvantes, bem como de novos antígenos é um importante passo para o desenvolvimento de vacinas com maior potencial de proteção. A obtenção de proteínas recombinantes é um fator limitante nos estudos de vacinas, no entanto, as fusões, assim como as proteínas individuais foram clonadas e purificadas com sucesso com tampão contendo 0,2 % de *N-Lauroylsarcosine*. Obtendo-se quantidades suficientes de antígenos para a inoculação dos animais (Figura 1).



Figura 1: Gel de poliacrilamida 15%, corado com *Coomassie blue*, das proteínas recombinantes purificadas e inoculadas em camundongos. 1: LTBR1; 2: R1; 3: LTBP42; 4: P42.

Na avaliação da resposta imune humoral, induzida pelos antígenos co-administrados, fusionados com LTB, ou co-administrados e acrescidos de adjuvante incompleto de Freund, foi possível observar a ação adjuvante da LTB (Fig. 2). Respostas semelhantes nos títulos de anticorpos foram observadas quando antígeno R1 foi confrontado com o soro dos animais inoculados com a fusão LTBR1, e com a co-administração dos dois antígenos mais o adjuvante incompleto de Freund.

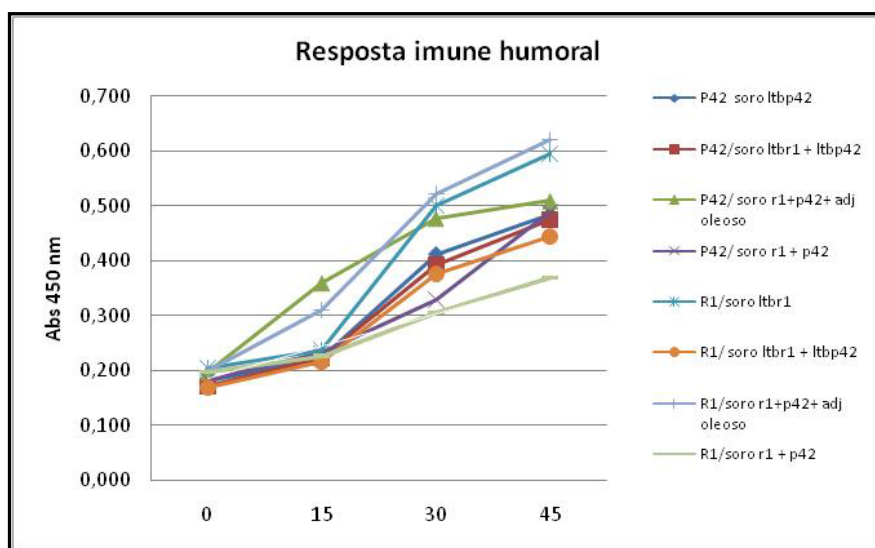


Figura 2: Resposta imune humoral do soro dos camundongos inoculados com as diferentes formulações vacinais, confrontados com os antígenos R1 e P42, avaliados através de ELISA.

4. CONCLUSÃO

Com base nos dados apresentados nesse trabalho podemos concluir que a LTB tem capacidade de incrementar a resposta imune de antígenos com ela fusionados. A fusão do antígeno R1 com a LTB proporcionou títulos médios de anticorpos semelhantes a do antígeno administrado com o adjuvante oleoso, demonstrando seu efeito adjuvante bem como a manutenção de epítomos conformacionais deste antígeno fusionado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BREWER, J.M. (How) do aluminium adjuvants work? **Immunology Letters**, v.102, p.10-15, 2006.

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**, v.26, p.4372-4378, 2008.

CONCEIÇÃO, F.R.; MOREIRA, A.N.; DELLAGOSTIN, O.A. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. **Vaccine**, v.24, p.5734-43, 2006

LECLERC, C. New approaches in vaccin development.**Comparative Immunology Microbiology Infectious Diseases**, v.26, p.329-41, 2003.

LIN, J.H.; WENG, C.N.; LIAO, C.W.; YEH, K.S.; PAN, M.J. Protective Effects of Oral Microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* Vaccine Prepared by Co-Spray Drying Method. **Journal Veterinary Medicce Science**, v.65, p.69-74, 2003.

ROSS, R.F. Mycoplasmal diseases. In: STRAW BE, D'ALLAIRE S, MENGELING WL, TAYLOR DJ. Diseases of Swine. Iowa State University Press, Ames, Cap.36, p.495–505, 1999.

SIBILA, M.;PIETERS, M.; MOLITOR, T.; MAES, D.; HAESBROUCK, F.; SEGALÉS, J. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **The Veterinary Journal**, v.181, p.221–231, 2009.

SIMMONS, C.P. et al. Immunomodulation using bacterial enterotoxins. **Scandinavian Journal Immunology**, v.53, p.218-226, 2001.