

## 1. Introdução

A pneumonia enzoótica suína (PES) é causada pela bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae*. Este patógeno se adere ao epitélio ciliado do trato respiratório suíno (Figura 1) causando inflamação aguda na traquéia, brônquios e bronquíolos (Maes *et al.*, 2008).

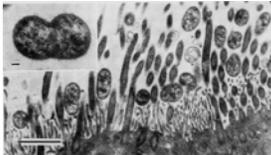


Figura 1: Microscopia eletrônica de um corte do epitélio do bronquíolo de um porco infectado por *M. hyopneumoniae*. (Tajima & Yagihashi, 1982).

Para o prevenção da PES são usadas vacinas compostas por células bacterianas inativadas (bacterinas), as quais tem alto custo de produção e são incapazes de evitar a colonização do hospedeiro por *M. hyopneumoniae* (Carr, 2006). Sendo assim, o desenvolvimento de vacinas utilizando antígenos recombinantes surge como uma alternativa promissora para o combate a PES. Para isso, é necessária a caracterização de um número maior de antígenos de *M. hyopneumoniae*, de modo a permitir a seleção daqueles a serem efetivamente incluídos em formulações vacinais recombinantes. Além disso, novos antígenos devem ser estudados e avaliados quanto ao seu potencial para utilização em imunodiagnóstico. Os testes rotineiramente usados para o imunodiagnóstico da PES, como o ELISA Tween 20 (ELISA-T), apresentam problemas de baixa sensibilidade (Erlanson *et al.*, 2005). Nesse contexto, a caracterização de novos antígenos que possam ser utilizados em ensaios imunodiagnósticos alternativos, e que possam, ainda, melhorar a sensibilidade dos testes atuais, torna-se de fundamental importância.

A partir do sequenciamento das linhagens 7448 e J de *M. hyopneumoniae* (Vasconcelos *et al.*, 2005), o trabalho de identificação de genes codificadores de proteínas potencialmente antigênicas foi acelerado, permitindo a seleção de diversos antígenos como candidatos para utilização em vacina contra PES. Várias destas proteínas tiveram a sua antigenicidade confirmada posteriormente através de estudos proteômicos (Pinto *et al.*, 2007). A utilização de alguns dos antígenos evidenciados em vacinação contra PES foi objeto de patenteamento pelas redes Projeto Genoma Brasileiro (BRGene) & Rede Sul de Análise de Genomas e Biologia Estrutural (PIGS) (patente nº. PI0306775-0).

## 2. Objetivos

Objetivo geral do projeto é caracterizar imunologicamente proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* com potencial para utilização em imunodiagnóstico e vacinação. O antígeno selecionado (MH1) neste trabalho é um provável fator de virulência estando localizado na superfície da bactéria.

Os objetivos específicos são a clonagem da sequência de DNA codificadora (CDS) de MH1 em vetores de expressão, a produção de MH1 na forma recombinante e a confirmação preliminar da sua imunogenicidade e antigenicidade.

## 3. Material e Métodos

### 3.1 Clonagens

A CDS de MH1 foi amplificada via PCR utilizando iniciadores primário e secundário (Figura 2), para incluir no amplicom, além da sequência codificadora desejada, parte da sequência do vetor de clonagem. O vetor escolhido foi o pcDNA 3.1 (+) (Invitrogen), para a construção de DNA recombinante de expressão em eucariotos. A clonagem foi realizada por recombinação homóloga *in vivo* em *Escherichia coli* da linhagem KC8 (Parrish *et al.*, 2004).

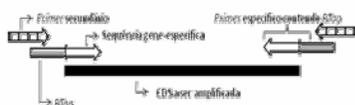


Figura 2: Amplificação do CDS do antígeno para clonagem.

### 3.2 Produção e purificação de MH1

A CDS de MH1 foi previamente clonada no vetor pGEX 4T-3 (GE Healthcare) expressa em fusão com glutatona-S-transferase (GST) em *E. coli* BL21 pLysE. A indução foi realizada com 0,1 mM de IPTG e a solubilização com 0,5% de sarcosil (Figura 4). A purificação de MH1 foi feita por cromatografia de afinidade com Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) e a porção de GST foi clivada com trombina. A proteína purificada foi eluída com PBS Triton X 100 0,5%.

### 3.3 Análise da antigenicidade e imunogenicidade da proteína por testes ELISA

Foram realizados testes ELISA utilizando 300 ng de MH1 por poço. Para a análise da antigenicidade foram utilizados soros suínos infectados por *M. hyopneumoniae*. Para a análise de imunogenicidade foram usados soros policlonais a partir da imunização de cinco camundongos BALB/c com 25 µg de MH1 purificado. Foi utilizado o anticorpo secundário com HRP IgG anti-mouse peroxidase (Sigma) 1:6000.

## 4. Resultados

### 4.1 Clonagens

Foram obtidos dois possíveis clones utilizando o vetor pcDNA 3.1 (+) (Figura 3) sendo que ambos serão confirmados através de sequenciamento. Após a confirmação, a expressão da CDS clonada será analisada em células de mamíferos. Em seguida será feita a imunização de camundongos com a construção de DNA para a avaliação da resposta imune celular e humoral induzida.

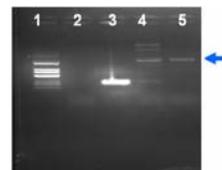


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose 1,2% dos produtos de amplificação de PCR para confirmação da clonagem de MH1 no vetor pcDNA 3.1 (+). 1- Marcador; 2- Controle negativo (sem DNA); 3- DNA do vetor; 4 e 5- Possíveis clones. A seta indica os produtos de amplificação correspondentes aos possíveis clones.

### 4.2 Produção e purificação de MH1

O rendimento do antígeno purificado é de 5 mg/L de cultura (Figura 5). A proteína recombinante purificada foi utilizada para a confirmação da sua imunogenicidade e antigenicidade.

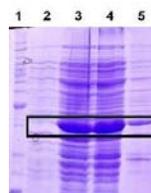


Figura 4: SDS-PAGE 12% da indução e solubilização de MH1. 1- Marcador (massa molecular); 2- Extrato não-induzido (antes do IPTG); 3- Extrato induzido (depois do IPTG); 4- Fração solúvel; 5- Fração insolúvel. A expressão de MH1 fusionada a GST está destacada pelo retângulo.

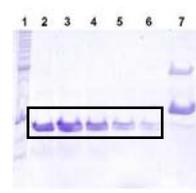


Figura 5: SDS-PAGE 15% da purificação de MH1. 1- Marcador (massa molecular); 2 a 6- eluições da proteína purificada (destacadas pelo retângulo). 7- resina.

### 4.3 Análise da antigenicidade e imunogenicidade de MH1

A proteína MH1 foi reconhecida por suínos infectados experimentalmente por *M. hyopneumoniae*, podendo ser caracterizada como antigênica (Figura 6). A resposta frente aos soros policlonais produzidas em murinos foi positiva caracterizando a proteína como imunogênica (Figura 7).

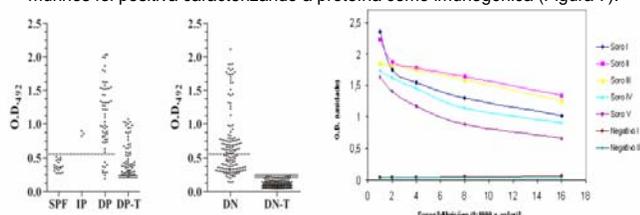


Figura 6: Análise da antigenicidade de MH1. ELISA com MH1 e ELISA-T. SPF: suínos livres de patógenos; IP: suínos imunizados com extrato proteico de *M. hyopneumoniae* 7448; DP: soro de suínos infectados por *M. hyopneumoniae* diagnosticado por ELISA-MH1; DP-T: amostras de suínos infectados por *M. hyopneumoniae* diagnosticados por ELISA-T; DN: soros de suínos diagnosticados por ELISA-MH1; DN-T: amostras de suínos testados como negativos por ELISA-T. Linha tracejada indica cut-off do ELISA-MH1 e a linha dupla indica cut-off do ELISA-T.

Figura 7: Análise da imunogenicidade de MH1. ELISA com cinco soros de camundongos imunizados com MH1 purificado. Controles negativos foram feitos com soros de dois camundongos não imunizados.

## 5. Referências Bibliográficas

Carr, J. The maintenance of health In: Kyriazakis, I.; Whittemore, T.C. Whittemore's Science and Practice of Pig Production. Oxford: Blackwell Publishing, 3. ed., pp 263-269, 2006.

Erlanson, K.R., *et al.* "Evaluation of three serum antibody enzyme-linked immunosorbent assays for *M. hyopneumoniae*". *J. Swine Health Prod.* 13, 198-203, 2005.

Maes, D., *et al.* "Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs." *Vet Microbiol* 126(4): 297-309, 2008.

Parrish, J. R., *et al.* "High-throughput cloning of *Campylobacter jejuni* ORIs by *in vivo* recombination in *Escherichia coli*." *J. Proteome Res* 3(3): 582-6, 2004.

Pinto P.M., *et al.* "Proteomic survey of the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 and identification of novel post-translationally modified and antigenic proteins". *Vet Microbiol.* 31:121(1-2):83-93, 2007.

Tajima, M. and T. Yagihashi. "Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the porcine respiratory epithelium as revealed by electron microscopy." *Infect Immun* 37(3): 1162-9, 1982.

Vasconcelos, A.T.; Ferreira, H. B.; Bizarro, C.V.; Bonatto, S. L.; Carvalho, M. O.; Pinto, P.M., *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* 187: 5568-5577, 2005.