

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL INDUZIDA POR BACTERINAS COMERCIAIS CONTRA *Mycoplasma hyopneumoniae* EM CAMUNDONGOS

ANDRESSA FISCH¹; VANESSA GALLI¹; CHARLES KLAZER GOMES¹; SILVANA BEUTINGER MARCHIORO¹; SÉRGIO JORGE¹; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO²

¹Laboratório de Vacinologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas - dessafh@hotmail.com

²Laboratório de Imunologia Aplicada, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas - fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Mycoplasma hyopneumoniae é o patógeno causador da Pneumonia Enzoótica Suína, doença respiratória crônica que acomete suínos em todo o mundo (THACKER, 2006), causando queda nos índices produtivos e grandes perdas econômicas (MAES et al., 2008). Vacinação e manejo ambiental são os principais métodos de controle da doença (CONCEIÇÃO et al., 2006; MAES et al., 2008). As vacinas comercialmente disponíveis consistem em bacterinas inativadas de alto custo que, embora reduzam o grau de lesão pulmonar, são incapazes de prevenir a infecção e estabelecimento do patógeno (THACKER et al., 1998; MEYNS et al., 2006). Identificar antígenos contra os quais estas vacinas não geram resposta imune satisfatória pode auxiliar na escolha de alvos potenciais a partir dos quais novas vacinas, mais eficazes, possam ser desenvolvidas. Este trabalho teve por objetivo avaliar a resposta imune humoral induzida pela administração de três diferentes bacterinas comerciais contra *M. hyopneumoniae* para as proteínas recombinantes R1, P102, P42 e NrdF, cuja atividade protetora já foi avaliada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

A proteína recombinante R1 foi expressa e purificada de acordo com CONCEIÇÃO et al. (2006). As proteínas recombinantes P102, P42 e NrdF foram obtidas segundo a metodologia descrita por SIMIONATTO et al. (2010).

2.2 Imunização dos camundongos

Para avaliação da resposta imune humoral, foram imunizados camundongos fêmeas BALB/c, com 6 a 8 semanas de idade, divididos em quatro grupos de seis animais, cuja identificação e protocolo de inoculação são descritos a seguir: grupo A, duas inoculações de 100 µL da solução comercial da Bacterina 1 com intervalo de 15 dias entre as doses; grupo B, duas inoculações de 100 µL da solução comercial da Bacterina 2 com intervalo de 15 dias entre as doses; grupo C, duas inoculações de 50 µL da solução comercial da Bacterina 3 com intervalo de 15 dias entre as doses; e grupo D (controle negativo), duas inoculações de 100 µL de solução salina 0,85% com intervalo de 15 dias entre as doses.

Os volumes administrados e o número e intervalo de inoculações estão de acordo com o recomendado pelos fabricantes para inoculação em suínos, respeitando-se a proporção para peso vivo em camundongos. O sangue dos animais foi coletado por punção do sino retro-orbital nos dias 0 (pré-imune) e 30 do experimento. O soro foi separado por centrifugação e armazenado a -20°C. Todos os animais foram mantidos durante o experimento de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas onde o projeto está registrado sob o número 200968.

2.3 Avaliação da resposta imune humoral

Para avaliar a produção de anticorpos induzida pela inoculação das bacterinas foi realizado um ELISA indireto, no qual os soros dos animais inoculados foram confrontados separadamente contra cada uma das proteínas recombinantes mencionadas. Microplacas de 96 cavidades foram sensibilizadas com rR1, rP102, rP42 ou rNrdF dissolvidas em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6. Após incubação *overnight*, as placas foram lavadas com PBS-T e incubadas a 37 °C por 2 h com 200 µL de solução de bloqueio (leite desnatado 5%). Posteriormente as placas foram lavadas com PBS-T e incubadas com soro dos camundongos diluído em 1:100 em solução de bloqueio a 37 °C por 2 h. Após nova lavagem, as cavidades foram incubadas a 37 °C por 1 h com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, diluído em 1:4.000 em tampão de bloqueio. A reação colorimétrica foi gerada com a adição de ortofenilenediamina e peróxido de hidrogênio. Após 15 minutos, a reação foi parada com a adição de 50 µL de 2M H₂SO₄. A absorbância foi determinada em filtro de 492 nm em leitor de ELISA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos no ELISA estão representados na Fig. 1.

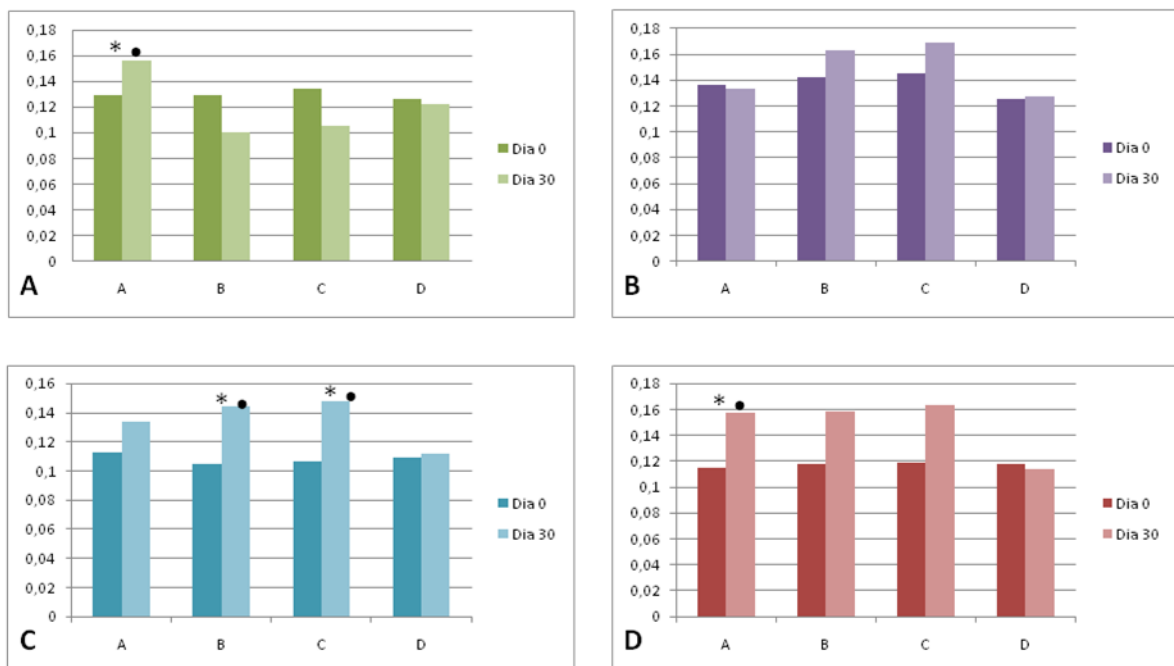


Figura 1. Imunidade humoral induzida pela inoculação de bacterinas comerciais em camundongos contra as proteínas recombinantes R1 (A), P102 (B), P42 (C) e NrdF (D). O eixo y apresenta os dados de absorbância absoluta em filtro 492 nm. O eixo x indica os grupos do experimento. As análises foram realizadas por Teste T, sendo $p < 0,05$. O símbolo (*) indica diferença estatística entre as coletas dos dias 0 e 30 dentro do mesmo grupo, e (•) indica diferença estatística em relação ao grupo controle negativo.

Para as proteínas recombinantes R1 e NrdF, apenas o grupo A apresentou produção de anticorpos estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (Fig. 1A e 1D). Para a proteína P102, não houve diferença estatística para nenhuma das bacterinas inoculadas. Para a proteína P42 ambos os grupos B e C apresentaram resposta imune humoral significativa.

As proteínas recombinantes utilizadas neste estudo tiveram sua antigenicidade avaliada por SIMIONATTO et al. (2011) e todas foram reconhecidas

por soros de suínos convalescentes, indicando que as proteínas nativas são ativamente expressas por cepas patogênicas durante o desenvolvimento da doença. A adesina P97 e a proteína de superfície P102 formam uma família cujas funções têm sido muito estudadas. O fragmento R1 da proteína P97 é responsável pela adesão do patógeno ao cílio respiratório. Anticorpos anti-R1 foram capazes de bloquear a aderência de *M. hyopneumoniae* a células ciliadas respiratórias suínas em ensaio de aderência *in vitro* (ZHANG et al., 1994) indicando sua relevância no processo de patogênese do *M. hyopneumoniae*. A proteína P102 está relacionada à ativação do plasminogênio que, uma vez transformado em plasmina, promove a destruição da fibrina e facilita o rompimento das barreiras teciduais pelo patógeno (SEYMOUR et al., 2012), podendo ser considerada um importante fator de virulência.

A proteína P42 é uma proteína de choque térmico (*heat shock protein*) e tem sua expressão aumentada em situações de estresse para a célula bacteriana. As HSP's apresentam capacidade de estimular o sistema imune inato através da interação com receptores celulares de superfície e de induzir a produção de moléculas pró-inflamatórias diversas (STEWART & YOUNG, 2004). CHOU et al. (1997) citam a capacidade de anticorpos monoespecíficos anti-P42 de limitar o desenvolvimento de *M. hyopneumoniae* em meio sólido, avaliado *in vitro* através de teste de inibição do crescimento (TIC), o que pode indicar grande importância no processo de desenvolvimento do microrganismo e, conseqüentemente, na ocorrência de processo patogênico durante a infecção. A proteína NrdF (subunidade R2 da ribonucleotídeo redutase) teve sua capacidade protetora em suínos avaliada por FAGAN et al. (1996), tendo sido capaz de diminuir o escore de lesão pulmonar para PES em suínos imunizados com esta proteína, em comparação com o grupo controle negativo.

Os dados obtidos demonstram que algumas bacterinas são incapazes de estimular, em camundongos inoculados, a produção de anticorpos contra importantes antígenos de *M. hyopneumoniae*, conforme já demonstrado por CONCEIÇÃO et al. (2006). Isso se deve, possivelmente, às alterações no perfil de expressão protéica do patógeno devido às numerosas passagens *in vitro* (ASSUNÇÃO et al., 2005), cujos cultivos são utilizados na fabricação destas bacterinas.

4. CONCLUSÕES

As bacterinas comercialmente disponíveis contra *M. hyopneumoniae* apresentaram perfis distintos de indução de imunidade humoral com relação às proteínas avaliadas. Considerando os estudos anteriores citados podemos sugerir que a produção de anticorpos contra essas proteínas pela vacinação é necessária para promover o bloqueio da aderência de *M. hyopneumoniae* e seus efeitos patogênicos sobre o hospedeiro suíno. A ausência ou indução insatisfatória de imunidade humoral contra antígenos comprovadamente protetores, como demonstrado neste estudo, é provavelmente responsável pela eficiência limitada das bacterinas avaliadas. Estudos posteriores mais abrangentes, que avaliem a resposta humoral e também celular de um número maior de vacinas disponíveis no mercado e contra outros antígenos potencialmente protetores são necessários para que se possa direcionar o estudo de alvos e identificar lacunas que, se preenchidas, podem levar a um processo de indução de imunidade mais eficaz.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSUNÇÃO, P., DE LA FE, C., RAMÍREZ, A.S., LAMAZARES, O.G., POVEDA, J.B. Protein and antigenic variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* strains by SDS-PAGE and immunoblot. **Vet Res Commun**, v.29, p.563-574, 2005.
- CHOU, S.Y.; CHUNG, T.L.; CHEN, R.J.; RO, L.H.; TSUI, P.I.; SHIUAN, D. Molecular cloning and analysis of a HSP (heat shock protein) like 42 kDa antigen gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Biochem Mol Biol Int**, v.4, n.4, p.821-831, 1997.
- 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.5734-5743, 2006.
- FAGAN, P.K.; DJORDJEVIC, S.P.; EAMENS, G.J.; CHIN, J.; WALKER, M.J. Molecular characterization of a Ribonucleotide Reductase (*nrdF*) Gene Fragment of *Mycoplasma hyopneumoniae* and assessment of the recombinant product as an experimental vaccine for Enzootic Pneumonia. **Infect Immun**, v.64, n.3, p.1060-1064, 1996.
- MAES, D.; SEGALLES, J.; MEYNS, T.; SIBILA, M.; PIETERS, M.; HAESEBROUCK, F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. **Vet Microbiol**, v.126, p.297-309, 2008.
- MEYNS, T.; DEWULF, J.; DE, K.A.; CALUS, D.; HAESEBROUCK, F.; MAES, D. Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. **Vaccine**, v.24, p.7081-7086, 2006.
- SEYMOUR, L.M.; JENKINS, C.; DEUTSCHER, A.T.; RAYMOND, B.B.A.; PADULA, M.P.; TACCHI, J.L.; BOGEMA, D.R.; EAMENS, G.J.; WOOLLEY, L.K.; DIXON, N.E.; WALKER, M.J.; DJORDJEVIC, S.P. Mhp182 (P102) binds fibronectin and contributes to the recruitment of plasmin(ogen) to the *Mycoplasma hyopneumoniae* cell surface. **Cell. Microb.**, v.14, n.1, p.81-94, 2012.
- SIMIONATTO, S.; MARCHIORO, S.B.; GALLI, V.; HARTWIG, D.D.; CARLESSI, R.M.; MUNARI, F.M.; LAURINO, J.P.; CONCEIÇÃO, F.R.; DELLAGOSTIN, O.A. Cloning and purification of recombinant proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli*. **Protein Expr Purif**, v.69, p.132-136, 2010.
- SIMIONATO, S.; MARCHIORO, S.B.; GALLI, V.; BRUM, C.B.; KLEIN, K.S.; REBELATTO, R.; SILVA, E.F.; BORSUK, S.; CONCEIÇÃO, F.R.; DELLAGOSTIN, O.A. Immunological characterization of *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant proteins. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v.35, p.209-216, 2012.
- STEWART, G.R.; YOUNG, D.B. Heat-shock proteins and the host-pathogen interaction during bacterial infection. **Curr Opin Immunol**, v.16, p.506-510, 2004.
- THACKER, E.L.; THACKER, B.J.; BOETTCHER, T.B.; JAYAPPA, H. Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. **J Swine Hlth Prod**, v.6, p.107-112, 1998.
- THACKER, E., Mycoplasmal diseases. In: STRAW, B.E., ZIMMERMAN, J.J., D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D.J. (Eds.). **Diseases of Swine**, 9th ed. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, 2006, .701-717.
- ZHANG Q.; YOUNG T.F.; ROSS R.F. Microtiter plate adherence assay and receptor analogs for *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Infect Immun**, v.62, p.1616-1622, 1994.