

AVALIAÇÃO DE UMA VACINA RECOMBINANTE CONTRA *LAWSONIA INTRACELLULARIS*

ILANA MAZZOLENI¹; NEIDA CONRAD²; VITÓRIA SEQUEIRA GONÇALVES³;
FRANCISCO DENIS SOUZA SANTOS⁴; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁵

¹Universidade Federal de Pelotas - ilana.mazzoleni@gmail.com;

²Universidade Federal de Pelotas – conradneida@gmail.com;

³Universidade Federal de Pelotas – vitoriasgon@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – denis.santos195@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com;

1. INTRODUÇÃO

No ano de 2019 o Brasil tornou-se o quarto maior exportador mundial de carne suína (EMBRAPA, 2020), evidenciando a importância da suinocultura na economia brasileira. Um dos maiores desafios deste setor é o controle de doenças infecciosas, como a Enteropatia Proliferativa (EP). O agente causador da EP é a bactéria Gram-negativa intracelular obrigatória *Lawsonia intracellularis*, patógeno intestinal com predominância em locais de produção suína em todo o mundo (DORS et al., 2015), atingindo aproximadamente 90% de diferentes países criadores (ARNALD et al., 2019). A doença atinge suínos em idade reprodutiva, de 5 a 7 meses, e é caracterizada por hiperplasia e inflamação do íleo e cólon, causando diarreia persistente e até mesmo enterite necrótica ou hemorrágica (CHOUET et al., 2003).

As vacinas comerciais disponíveis contra EP são constituídas da bacterina ou de células vivas atenuadas de *L. intracellularis*, exigindo cultivo em larga escala com culturas em suspensão, tornando alto o custo de produção (KRUSE et al., 2016). Além disso, apresentam falhas na indução de imunidade e podem ser necessárias intervenções adicionais para controlar a Enteropatia Proliferativa (RIBER et al., 2015; KRUSE et al., 2016).

Estudos baseados em vacinologia reversa destacam uma proteína com potencial antigênico conservada em todas as cepas conhecidas de *L. intracellularis* e que apresenta 98% de similaridade do gene 16S-rDNA com cepas que infectam outros animais. Esta proteína foi reconhecida pelo soro de suínos infectados com *L. intracellularis*, indicando que esta proteína é reconhecida pelo sistema imunológico e sugere expressão consistente em seu hospedeiro natural (WATSON et al., 2014).

Um desafio para o desenvolvimento de vacinas recombinantes é sua baixa imunogenicidade, resultante da pureza dos antígenos de subunidade e à diminuição de componentes imunomoduladores (GUPTA et al., 2014). O uso de adjuvantes e associação com moléculas carreadoras são estratégias para aprimorar o desempenho das vacinas (GUPTA et al., 2014). O peptídeo derivado do toxoide tetânico (TT) demonstrou capacidade de induzir a produção de anticorpos e de superar a inibição da resposta imune contra o antígeno vacinal (TYMCIU et al., 2004).

O objetivo desse estudo foi expressar a proteína recombinante de *L. intracellularis*, fusionada a molécula TT-Th (rLiTT) e avaliar sua imunogenicidade em camundongos.

2. METODOLOGIA

A sequência LiTT foi inserida no vetor pet/28a e o plasmídeo recombinante LiTT/pet28a foi transformado em células *E. coli* BL21 Star™ (DE3). A indução da expressão foi realizada pela adição de 1 mM de IPTG por 4 h a 37 °C. As células foram recuperadas por centrifugação, sonificadas e eluídas em tampão *wash* contendo ureia 8 M. A proteína recombinante (rLiTT) solubilizada foi purificada utilizando o sistema ÄKTA Prime (GE Healthcare). A expressão e purificação de rLiTT foram verificadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e caracterizada através de *Western Blot*, onde a proteína foi eletrotransferida para uma membrana de nitrocelulose. Foram adicionados à membrana o anticorpo anti-histidina (1:5000) e, posteriormente o anticorpo anti-camundongo (1:5000) conjugado à peroxidase. Entre cada uma das etapas a membrana foi incubada sob agitação a temperatura ambiente e lavada 5X com PBS-T (solução salina fosfatada contendo Tween-20). A detecção antígeno/anticorpo foi visualizada pela adição de solução cromógena contendo DAB (diaminobenzidina), sulfato de níquel e peróxido de hidrogênio.

Para avaliar a imunogenicidade de rLiTT, 15 camundongos Balb/c fêmeas foram alocados em três grupos: 1. rLiTT (100 µg) adsorvido em 10% de hidróxido de alumínio [(Al(OH)₃; Sigma Aldrich)]; 2. Vacina comercial Enterisol® Ileitis (Boehringer Ingelheim) usando 1/20 da dose recomendada (dose de 2 ml para suínos) e 10% de hidróxido de alumínio; 3. Solução salina adicionada de 10% de hidróxido de alumínio. Os animais foram inoculados por injeção subcutânea (200 µl) nos dias 0 e 21. Amostras de sangue foram coletadas por punção submandibular em intervalos de 7 dias em um total de 42 dias. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA nº 28134-2019) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).

A avaliação da resposta imune humoral foi verificada através de ensaio imunoenzimático (ELISA). Placas de 96 cavidades foram revestidas com 100 ng/cavidade de rLiTT ou com a vacina comercial. Ambos os antígenos foram diluídos em tampão carbonato bicarbonato (pH 8,0) e incubadas por 18 h a 4 °C. Os soros foram diluídos (1:100) em PBS e aplicados em triplicata às placas. Posteriormente, foram adicionados anticorpos anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich), diluídos 1:5000 em PBS. Entre cada etapa as placas foram incubadas por 1 h a 37 °C e lavadas 5 vezes com PBS-T. Por fim, foi adicionado 100 µL de solução de revelação (10 mL de tampão fosfato-citrato 0,004 g de Ortho-Phenylenediamine (Sigma-Aldrich) e 15 µL de H₂O₂), deixando reagir por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Para interromper a reação, foram adicionados 50 µL por cavidade de H₂SO₄ 2N. As absorbâncias foram medidas em leitor de microplacas EZ Read 400 (Biochrom, UK) com filtro de 492 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteína rLiTT foi expressa de forma insolúvel, sendo solubilizada em tampão contendo 8M de uréia. A avaliação da expressão, após purificação da proteína, demonstrou a presença de uma banda esperada de aproximadamente 18 kDa em SDS-PAGE, sugerindo a expressão de rLiTT. A expressão da proteína foi confirmada pela detecção por anticorpos anti-Histidina através *Western blot* (Figura 1).

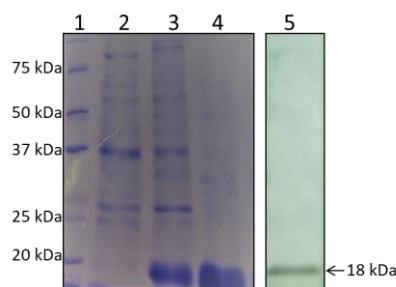


Figura 1. Expressão e caracterização da proteína rLiTT. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. 1. Marcador de massa molecular; 2. Cultivo sem indução; 3. Cultivo com indução; 4. rLiTT purificada; 5. Detecção da proteína rLiTT pelo anticorpo anti-histidina através de *Western blot*.

Camundongos vacinados com rLiTT apresentaram anticorpos IgG específicos após uma única dose (dia 14). O nível de anticorpos após o reforço foi 4 vezes superior ao dia 0 e ao grupo controle (PBS). Este nível manteve-se até o final do estudo (Figura 2A). O grupo inoculado com a vacina comercial apresentou resposta significativa ao antígeno vacinal, contudo inferior à resposta do grupo vacinado com rLiTT (Figura 2A). O grupo controle, inoculado apenas com tampão salino (PBS), não apresentou anticorpos contra rLiTT ou a vacina comercial. A titulação dos anticorpos revelou que o soro de ambos os grupos foi capaz de reconhecer o respectivo antígeno até o título de 6400 (Figura 2B).

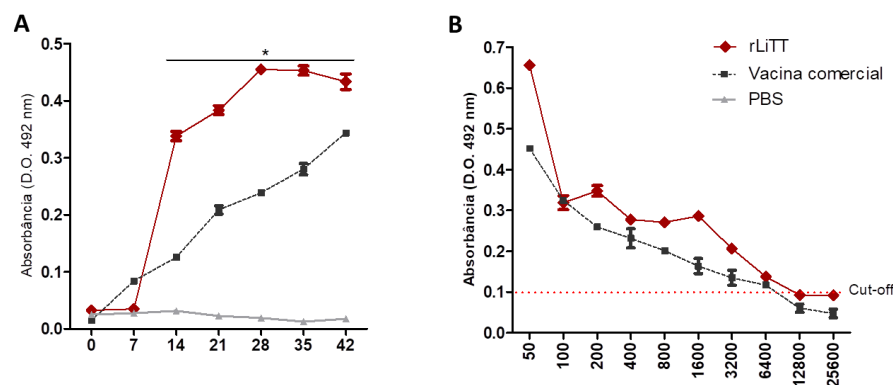


Figura 2. Dinâmica dos anticorpos IgG total produzida em camundongos vacinados com rLiTT e vacina comercial. Dados referentes a média dos valores obtidos pelo teste de ELISA. Foram utilizado pool de soros de cada grupo vacinal. O gráfico demonstra a densidade óptica média (D.O.492 nm) de triplicatas, com avaliação dos soros em pool. A) Resposta à imunização ao longo do experimento. Asterisco (*) representa diferença estatística ($P < 0.05$) entre os grupos vacinados. B) Titulação dos anticorpos. O *cut-off* foi determinado na média dos valores obtidos no dia 0 mais 3 vezes o desvio padrão.

Devido ao peso molecular da molécula recombinante e seu nível de pureza, foi necessário a adição de uma molécula carreadora para aumento da imunogenicidade. Algumas das estratégias para essa ampliação incluem a construção de moléculas contendo múltiplas cópias do peptídeo ou fusão com proteínas transportadoras, como albumina de soro bovino (BSA), toxóide tetânico (TT), ovalbumina (OVA) (SHARMA et al. 2014). Outra molécula utilizada é a subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) que possui a capacidade de estimular uma resposta sistêmica e secretora de anticorpos IgA contra antígenos acoplados (YAMAMOTO et al., 2001; CONCEIÇÃO et al., 2006). O uso do epitopo de linfócitos T auxiliares derivado do Toxóide tetânico (TT-Th)

como molécula carreadora da tem como objetivo melhorar a apresentação de peptídeos derivados de antígenos por meio de moléculas MHC de classe I e classe II e, como consequência, aumenta as respostas imunes celulares e humorais, respectivamente (TYMCIU et al., 2004).

No presente trabalho foi possível verificar a imunogenicidade da molécula recombinante, sendo capaz de induzir uma resposta imune específica, com a presença de IgG superior ($P < 0.05$) ao grupo vacinado com a vacina comercial a partir do dia 14, seguindo assim até o final do experimento. A resposta celular será avaliada pela transcrição de citocinas (IL-4, IL-8, IL-17, IFN- γ) nos esplenócitos de e proliferação celular nos camundongos vacinados com LiTT. Posteriormente, para determinar o potencial de rLiTT em induzir proteção contra Enteropatia Proliferativa o estudo será realizado em suínos.

4. CONCLUSÕES

A proteína rLiTT adsorvida em hidróxido de alumínio foi capaz de induzir resposta imune humoral em camundongos, apresentando dinâmica de IgG superior à vacina comercial.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNALD, M.; CRIENEN, A.; SWAM, H.; VON BERG, S.; JOLIE, R.; NATHUES, H. Prevalence of *Lawsonia intracellularis* in pig herds in different European countries. **Porcine Health Management**, v. 5, p. 32-43, 2019.
- CHOUET, S.; PRIETO, C.; MIELI, L.; VEENHUZEN, M. F.; MCORIST, S. Patterns of exposure to *Lawsonia intracellularis* infection on European pig farms. **Veterinary Record**, v.152, p. 14–17, 2003.
- 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 enterotoxina B subunit elicits immune response in mice. **Vaccine**, v. 24, p. 5734-5743, 2006.
- DORS, A.; POMORSKA-MÓL, M.; CZYZEWSKA, E.; WASYL, D.; PEJSKAK, Z. Prevalence and risk factors for *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella* spp. in finishing pigs in Polish farrow-to-finish swine herds. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 18, p. 825–831, 2015.
- GUPTA, R. K.; RELYVELD, E. H.; LINDBLAD, E. B.; BIZZINI, B.; BEN-EFRAIM, S.; GUPTA, C. K. Adjuvants — a balance between toxicity and adjuvanticity. **Vaccine**, v. 11, p. 293–306, 1993.
- KRUSE, A. B.; DE KNEGT, L. V.; NIELSEN, L. R.; ALBAN, L. No Clear Effect of Initiating Vaccination against Common Endemic Infections on the Amounts of Prescribed Antimicrobials for Danish Weaner and Finishing Pigs during 2007–2013. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 3, p. 120, 2017.
- SHARMA, S.; MCDONALD, I.; MILLER, L.; HINDS, L. A. Parenteral administration of GnRH constructs and adjuvants: Immune responses and effects on reproductive tissues of male mice. **Vaccine** v. 32, p. 5555–5563, 2014.
- TYMCIU, S.; DURIEUX-ALEXANDRENNE, C.; WIJKHUISEN, A.; CRÉMINON, C.; FROBERT, Y.; GRASSI, J.; BOQUET, D. Enhancement of Antibody Responses in DNA Vaccination Using a Vector Encoding a Universal T-Helper Cell Epitope. **DNA and Cell Biology**, v. 23, p. 395–402, 2004.
- WATSON, E.; ALBERDI, M. P.; INGLIS, N. F.; LAISON, A.; PORTER, M. E.; MANSON, E.; SMITH, D. G. E. Proteomic analysis of *Lawsonia intracellularis* reveals expression of outer membrane proteins during infection. **Veterinary Microbiology**, v. 174, p. 448–455, 2014.
- YAMAMOTO, M.; MCGHEE, J. R.; HAGIWARA, Y.; OTAKE, S.; KIYONO, H. Genetically manipulated bacterial toxin as a new generation mucosal adjuvant. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 53, p. 211-217, 2001.