

Desenvolvimento e avaliação de novas estratégias de imunização contra colibacilose suína¹

Simone Simionatto^{2*}, Eliana K. Vaz³, André Michelin², Fabiana K. Seixas² e Odir Antônio Dellagostin²

ABSTRACT.- Simionatto S., Vaz E.K., Michelin A., Seixas F.K., Dellagostin O.A. 2005. [Development and evaluation of new strategies for immunization against swine colibacillosis.] Desenvolvimento e avaliação de novas estratégias de imunização contra colibacilose suína. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 25(2):84-90. Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Biotecnologia, UFPel, Campus Capão do Leão, Cx. Postal 354, Pelotas, RS 96010-900, Brazil. E-mail: ssimionatto@bol.com.br

Swine colibacillosis caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* remains one of the main sanitary problems in pig farms. The recombinant DNA technology offers the possibility of developing new immunization strategies. This paper describes the development of a subunit vaccine through the expression and purification of the *E. coli* K88 FaeC fimbrial protein. The gene that codes for this antigen was amplified by PCR and cloned into an *E. coli* expression vector fused to a 6X histidine tag. The recombinant protein was purified by affinity chromatography and used for mice immunization. In parallel, the same gene was cloned into an eucariotic expression vector with the addition of the Kozak sequence for improving translation of this gene in muscle cells. The resulting plasmid named pUP310 was purified in large scale and used to immunize mice. The immune response afforded by both forms of immunization was monitored by ELISA. There was an immune response in mice inoculated with pUP310 and purified FaeC. It was possible to detect anti-FaeC antibodies 42 days after the first inoculation. The antibody titer increased with time, being still detectable 7 months after the first inoculation. It is concluded that recombinant FaeC and pUP310 are potential tools for immunization of swine against *E. coli* K88.

INDEX TERMS: Swine colibacillosis, FaeC, *Escherichia coli*, DNA vaccine, recombinant vaccine.

RESUMO.- Colibacilose suína causada por *Escherichia coli* enterotoxigênica continua sendo um dos principais problemas sanitários na criação de suínos. A tecnologia do DNA recombinante proporciona a possibilidade de desenvolvimento de novas estratégias de imunização. Neste trabalho é descrito o desenvolvimento de uma vacina de subunidade através da produção e purificação da proteína FaeC da fimbria de *E. coli* K88. O gene que codifica este antígeno foi amplificado por PCR e clonado em um vetor de expressão em *E. coli*, fusionado a uma cauda de

histidinas. A proteína recombinante expressa por esta bactéria foi purificada, e depois de quantificada foi utilizada para imunizar camundongos. Paralelamente a isso, o mesmo gene foi clonado no vetor de expressão em célula eucariótica, introduzindo a seqüência de Kozak para favorecer a tradução deste gene em células musculares. O plasmídeo resultante, denominado pUP310, foi produzido em larga escala e também utilizado na imunização de camundongos. A resposta imune induzida por ambas formas de imunizações foi monitorada por ELISA, onde o antígeno utilizado foi a proteína FaeC purificada. Houve indução de resposta imune nos camundongos inoculados com pUP310 e FaeC purificada. Foi possível detectar anticorpos anti-FaeC 42 dias após a primeira inoculação e este título foi aumentando, sendo ainda detectável 7 meses após a primeira inoculação. Conclui-se que pUP310 e FaeC recombinante são candidatos potenciais para imunização de suínos contra *E. coli* K88.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Colibacilose suína, FaeC, *Escherichia coli*, vacina de DNA, vacina recombinante.

¹ Recebido em 5 de dezembro de 2003.

Aceito para publicação em 26 de junho de 2004.

Apóio financeiro da FAPERGS e do CNPq.

² Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Biotecnologia, UFPel, Campus Capão do Leão, Cx. Postal 354, Pelotas, RS 96010-900, Brasil.

*Autor para correspondência. E-mail: ssimionatto@bol.com.br

³ Depto Clínica e Patologia Animal, CAV/UESC, Av. Luiz de Camões 2090, Lages, SC 88520-000.

INTRODUÇÃO

A suinocultura vem, ao longo dos tempos, desenvolvendo-se e buscando um mercado cada vez mais especializado (Anônimo 2002). Esta é uma atividade que propicia ótimas oportunidades para investimentos, e também a possibilidade de transformar matéria-prima bruta em produtos de maior valor agregado, como carne e derivados industrializados. A atividade suínica tem apresentado, em nível internacional, uma tendência de concentração e especialização, caracterizando-se pela produção cada vez mais eficiente, praticada por um número cada vez menor de produtores (Lucia Jr et al. 2000).

As diarreias constituem um fator limitante da produção suína, e afetam animais em todas as fases de crescimento, provocando atraso no desenvolvimento ou até a morte dos animais (Mooi & Graaf 1985). Um dos mais importantes problemas de saúde, associados à produção suína é a diarreia neonatal causada por cepas de *Escherichia coli* enterotoxigênicas (Broeck et al. 2000). Este agente etiológico é responsável por 48% das mortes em animais não desmamados (Leman et al. 1986). Entre os fatores de patogenicidade de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) estão as fimbrias, que possibilitam a sua aderência ao epitélio intestinal, e a produção de toxinas pela bactéria (Oudega & Graaf 1988). As principais fimbrias de ETEC causadoras de diarreia em suínos são K88 (F4), K99 (F5), P987 (F6) e F41 (Sobestiansky et al. 1999). A maioria das cepas de *E. coli* causadoras de diarreias em suínos apresentam a fimbria K88 portadora das variantes antigênicas "ab, ac e ad" (Choi et al. 1999). Seis genes estruturais estão envolvidos na biogênese da fimbria K88 (Mooi & Graaf 1985). O FaeC é um polipeptídeo com aproximadamente 16,9 kDa e localiza-se na extremidade das fimbrias K88, e portanto, possivelmente tenha uma participação importante na adesão da fimbria ao epitélio intestinal (Bakker et al. 1992).

As bacterinas comerciais contra a diarreia em suínos conferem uma proteção satisfatória aos animais, mas podem apresentar endotoxinas, que por sua vez podem provocar abortos em fêmeas gestantes (Isaacson 1994). A tecnologia do DNA recombinante pode ser utilizada para o desenvolvimento de novas e modernas vacinas. As vacinas de segunda geração, ou de subunidade, têm o potencial de conferir proteção, sem o risco de causar a doença. Mais recentemente, começaram a ser desenvolvidas vacinas ditas de terceira geração, ou seja, vacinas de DNA. Estas também não apresentam risco de causar a doença, e têm a vantagem de possibilitar a indução de ambos os tipos de imunidade protetora, humoral e celular, com estimulação tanto de linfócitos T CD4 como de T CD8 citotóxicos, sem o risco associado a vacinas de organismos vivos (Silva 1997). Estas vacinas produzem a proteína dentro da célula, estimulando assim as duas classes do sistema MHC (Babiuk et al. 2000).

A expressão de proteínas de bactérias em células eucarióticas pode ser problemática, pois existe diferença nos sinais de transcrição e tradução nestes dois tipos de células. A transcrição de um gene bacteriano em células de animais pode ser possibilitada através do uso de promotores de eucariotos. Enquanto células bacterianas utilizam um sítio de ligação do ribossomo próximo do códon de iniciação, em células eucarióticas o ribossomo inicia a tradução a partir do primeiro ATG encontrado no RNA mensageiro. Kozak (1981) observou que a maioria dos genes de

eucariotos caracterizados até então apresentavam geralmente "A" na posição -3 (antes do códon ATG) e "G" na posição +4 (depois do códon ATG). Mutações afetando o A⁻³ e o G⁺⁴ enfraquecem a iniciação da transcrição, tanto *in vivo* como *in vitro* (Kozak 1997). Portanto, genes de procariotos podem ter a tradução aumentada se apresentarem à chamada seqüência de Kozak (AxxATGG). Foi demonstrado que alguns genes, como o da preproinsulina humana, têm sua tradução aumentada em até 20 vezes na presença desta seqüência (Kozak 1986). A expressão protéica do gene hCG em dictyostelium foi aumentada em até 50% com a introdução da seqüência de Kozak neste gene (Vervoort et al. 2000).

Este trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade imunogênica da proteína FaeC, localizada na extremidade da fimbria K88, visando a sua utilização para o desenvolvimento de vacina contra a colibacilose suína. Para isso, foram utilizadas duas estratégias: a produção de uma vacina de subunidade constituída da proteína purificada, e o desenvolvimento de uma vacina de DNA constituída do gene *faeC* acrescido da seqüência de Kozak. A avaliação das mesmas foi realizada em camundongos, demonstrando uma resposta imune humoral elevada e duradoura.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do gene *faeC*. O *faeC* foi amplificado por PCR a partir de cultura de *Escherichia coli* E68 portadora da fimbria K88. Para esta amplificação foram utilizados os primers *faeC* F: 5' ACC ATG GCG GTT CAA AAA ACC ATA TTC AG 3' e *faeC* R: 5' CCT CTA GAC TAC CTA TGA TAA GTG ACA ACA 3'. No primer *faeC* F foi acrescentado a seqüência de Kozak (em negrito) visando melhorar a expressão gênica em células eucarióticas. O PCR foi realizado em um volume final de 50µl, contendo 50ng de DNA plasmidial extraído de *E. coli* E68, 6ng/µl de cada oligonucleotídeo, 1 unidade de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen), 2mM de MgCl₂, 0,2mM dNTP e 10% de tampão da enzima Taq DNA polimerase. A reação foi submetida a um passo de desnaturação inicial (94°C, 5min), seguido por 30 ciclos de desnaturação (94°C, 1min), anelamento (50°C, 1min) e extensão (72°C, 1min). Após os 30 ciclos, a reação foi submetida a um ciclo final de extensão a 72°C por 7min.

Clonagem do *faeC* no vetor pTarget. O fragmento amplificado no PCR foi clonado no vetor pTarget, contido no pTARGET™ *Mammalian Expression Vector System* (Promega) segundo instruções do fabricante. Para tanto, foi utilizados 1µl do produto de PCR, 1µl do vetor pTarget, 1 unidade de T4 DNA ligase, 1µl de tampão de reação 10X e 6µl de água Milli-Q. A seguir a reação foi incubada por 12 horas a 4°C. O produto da ligação foi usado para transformar *E. coli* JM109 por choque térmico. A transformação foi realizada com 100µl de células competentes às quais foram adicionados 3µl da reação de ligação. Após incubação em gelo por 30min, seguido de choque térmico por 45 segundos a 42°C, e nova incubação em gelo por 2min., foram adicionados 900µl de meio SOC (Sambrook & Russell 2001), e incubado a 37°C por 1 hora. Um volume de 100µl foi então plaqueado em meio LB contendo 50 µg/ml de ampicilina, e as placas foram incubadas por 16 horas a 37°C. Colônias que cresceram na placa foram submetidas a uma triagem rápida pelo método microprep (Jouglard et al. 2002). Clones que apresentavam inserto foram selecionados e cultivados em meio LB contendo 50 µg/ml de ampicilina, por 16 horas a 37°C em incubador com agitação orbital. Esta cultura foi submetida à extração de DNA plasmidial utilizando-se o QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Alemanha), conforme instruções do fabricante. Posteriormente, este

DNA foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xba*I. Um plasmídeo recombinante cujo inserto estava na orientação horária foi selecionado e denominado pUP310. Este clone foi cultivado em um volume de 500 ml de LB, nas mesmas condições que a anterior, e submetido à extração de DNA em larga escala usando o *kit Qiagen-tip 2500* (Qiagen, Alemanha).

Construção do pAE/*faeC*. O DNA do pUP310 foi digerido com *Bam*HI, *Hind*III e *Pst*I e a banda correspondente ao gene *faeC* foi excisada do gel e submetida a uma purificação por *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences). Este fragmento foi então ligado ao vetor pAE, que já havia sido clivado com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III e desfosforilado com fosfatase alcalina, seguindo as recomendações de Sambrook & Russell (2001). A reação de ligação foi mantida a 16°C por 2 horas, e posteriormente o produto desta reação foi usado para transformar células competentes de *E. coli* JM109 nas mesmas condições citadas acima. A seleção de clones recombinantes foi realizada conforme já descrito. Um dos clones recombinantes foi inoculado em meio de cultura LB contendo ampicilina 50 µg/ml e cultivado a 37°C por 16 horas. Deste cultivo foi realizada extração de DNA plasmidial utilizando-se o *kit QIA prep Spin Miniprep* (Qiagen). O DNA resultante da extração foi utilizado para transformar *E. coli* BL21(DE3), BL21(DE3)SI, BL21(DE3)codon Plus e BL21(DE3)pLysS, conforme metodologia já descrita.

Expressão e purificação da proteína FaeC. Foi selecionada uma colônia de cada cepa de BL21(DE3) e cultivada em meio de cultura 2YT (Sambrook & Russell 2001) em agitador orbital a 250 rpm a 37°C. A cepa SI foi crescida na ausência de sal. Após atingir densidade ótica a 600 nm (OD₆₀₀) entre 0,5 e 0,7, uma amostra foi coletada para servir como controle não induzido. Em seguida, foi adicionado 1 mM de IPTG. A cepa SI foi induzida com 300 mM de NaCl. Três horas após a adição do IPTG ou NaCl, o cultivo foi finalizado e uma amostra foi retirada. As amostras destes cultivos foram processadas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida segundo metodologia descrita por Sambrook & Russel (2001). A cepa de BL21(DE3), que expressou a proteína FaeC em maior quantidade, foi selecionada, cultivada em larga escala e submetida a purificação através do *kit QIA expressionist* (Qiagen, Alemanha). A proteína assim purificada foi quantificada pelo método de microtitulação de Bradford para posteriormente ser utilizada para imunização de camundongos.

Imunização de camundongos. O DNA do pUP310 e a proteína FaeC purificada foram utilizados na inoculação de camundongos BALB/c fêmeas por via intramuscular. Utilizaram-se 4 grupos de 5 animais cada, onde o primeiro grupo foi inoculado com o pUP310 (pTargeT/*faeC*), o segundo com a proteína FaeC purificada, o terceiro recebeu somente solução salina e o quarto recebeu uma vacina comercial (bacterina) contra colibacilose suína. Foram aplicadas duas doses num intervalo de tempo de 21 dias. Os animais do Grupo 1 receberam 50 µl de sacarose a 25% e 30 min após, receberam 100 µl contendo 100 µg de pUP310 (pTargeT/*faeC*). O Grupo 2 recebeu 100 µg de FaeC, onde a primeira inoculação foi feita com adjuvante completo de Freund e a segunda com adjuvante incompleto de Freund. O grupo inoculado com salina recebeu um volume de 100 µl em cada inoculação. O grupo inoculado com vacina comercial recebeu duas doses de 100 µl, também via intramuscular. As amostras de sangue foram obtidas por punção do seio venoso retrocular no dia zero, antes da segunda inoculação e depois a cada 21 dias.

Avaliação da resposta imune induzida pela vacina de DNA e pela vacina de subunidade. A resposta imune foi monitorada por ELISA, onde o antígeno utilizado foi a proteína FaeC purificada. Placas de poliestireno foram sensibilizadas com 20 µg/ml de proteína FaeC purificada e incubadas a 37°C por 2 horas. Posteriormente, foram lavadas 3 vezes com PBS-T (tampão salina

fosfato pH 7,6, contendo Tween 20 a 0,05%). As placas foram bloqueadas com leite em pó desnatado 0,25% por 1 hora a 37°C e lavadas novamente 3 vezes com PBS-T. Após, colocou-se os soros testes diluídos 1/50 em PBS-T e incubou-se a 37°C 1 hora. A seguir foram feitas três lavagens com PBS-T e adicionou-se o soro anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com peroxidase (DAKO), seguido por uma incubação a 37°C por 1 hora. Após 5 lavagens com PBS-T foi adicionado o substrato ELISA-OPD Peroxidase (SIGMA) e incubado por 30 min a temperatura ambiente em local escuro. A leitura da densidade óptica foi feita a 450 nm em um leitor de ELISA (Dynatech MR 700).

Para eliminar a interferência de fatores inespecíficos nas leituras de ELISA, as absorbâncias de cada amostra foram divididas pela do soro pré-imune do mesmo animal. Nesta forma, o valor do soro pré-imune é sempre 1, sendo os valores dos soros imunes referidos a ele. Os títulos são expressos em unidades de ELISA, determinados segundo o seguinte quociente: Unidades de ELISA = Absorbância da amostra / absorbância soro pré-imune.

Uma eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada utilizando-se a proteína FaeC purificada e amostras do cultivo bacteriano de *E. coli* E68. Foi realizada a transferência destas proteínas para uma membrana de nitrocelulose Hybond™ ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech) e o bloqueio foi feito com leite em pó desnatado a 5%. A membrana foi incubada durante 1 hora com os soros testes diluídos 1/10 em PBS-T. Foram efetuadas três lavagens com TBS e adicionado soro anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com peroxidase (DAKO). Após incubação de 1 hora a temperatura ambiente, a membrana foi lavada 5 vezes com TBS-T e adicionado o substrato (DAB Peroxidase, SIGMA). Após 15 min a reação foi interrompida com água destilada.

Análise estatística. Os resultados obtidos no teste de ELISA dos animais vacinados foram submetidos à análise de variância de Kruskal-Wallis, para dados não paramétricos, versão Statistix 7.0.

RESULTADOS

A amplificação do *faeC* por PCR foi obtida com a temperatura de anelamento de 50°C. O fragmento do gene *faeC* amplificado foi purificado e ligado com o vetor pTargeT. Após transformação de *Escherichia coli* JM109, clones recombinantes foram identificados e cultivados em meio líquido. O DNA plasmidial extraído destes clones foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xba*I para indicar a orientação do inserto. As amostras com inserto no sentido horário apresentaram um fragmento de 522 pb e outro de 5.650 pb. Alguns clones digeridos com estas mesmas enzimas apresentaram um fragmento de 28 pb e outro de 6.144 pb, indicando a presença do inserto na orientação anti-horária. Um clone recombinante que apresentou o inserto do *faeC* no sentido horário foi selecionado e denominado pUP310. O mapa da deste plasmídeo encontra-se na Fig. 1.

A extração do pUP310 em larga escala, a partir de uma cultura de 500 ml, resultou em 3,5 ml de DNA na concentração de 1,1 µg/µl. Este DNA foi submetido a uma digestão com enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III que confirmou a presença do inserto contendo o gene *faeC*.

O plasmídeo pUP310 foi digerido com *Bam*HI e *Hind*III e a banda correspondente ao inserto contendo o gene *faeC* foi excisada do gel e purificada. O fragmento de DNA obtido foi ligado com o vetor pAE, previamente digerido com as mesmas enzimas e tratado com fosfatase alcalina. A transformação de *E. coli* JM109, com o produto da ligação, resultou em dezenas de

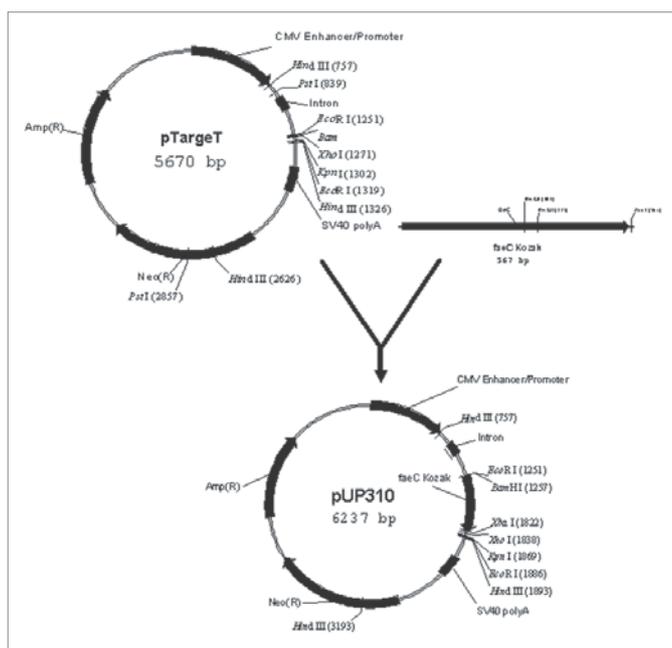


Fig. 1. Mapa do plasmídeo pUP310.

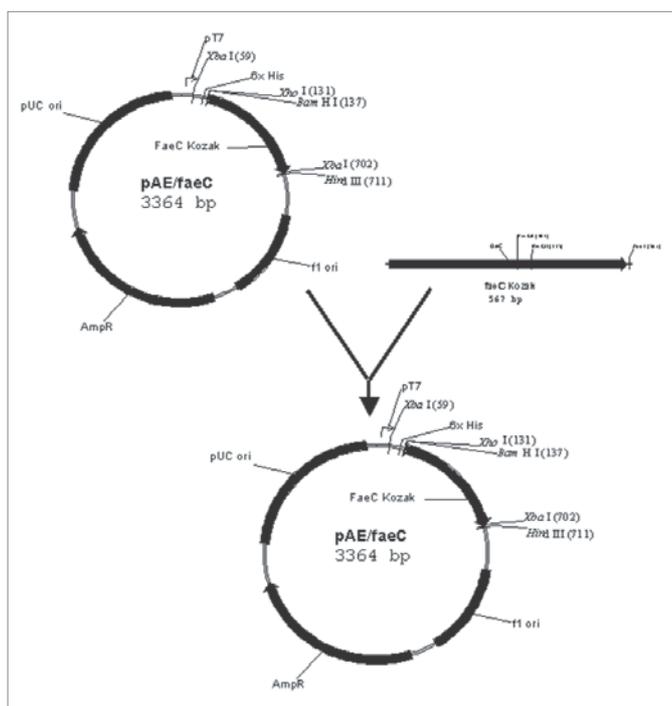


Fig. 2. Mapa do plasmídeo pAE/faeC.

transformantes. Foi selecionado um clone recombinante, cultivado e submetido à extração de DNA plasmidial. A presença do inserto *faeC* foi confirmada através de clivagem do DNA com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III. O plasmídeo recombinante foi denominado pAE/*faeC*. Na Fig. 2 encontra-se o mapa do vetor pAE e do inserto *faeC*, bem como o plasmídeo resultante da clonagem destes fragmentos.

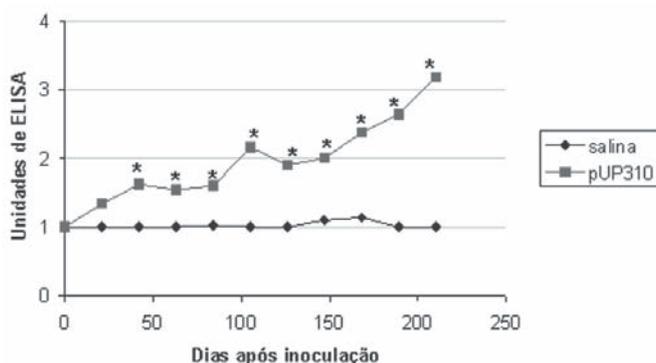


Fig. 3. Resposta imune apresentada em Unidades de ELISA de camundongos inoculados com a vacina de DNA pUP310 (pTargetT/*faeC*) e do grupo controle (salina). Asteriscos representam diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.

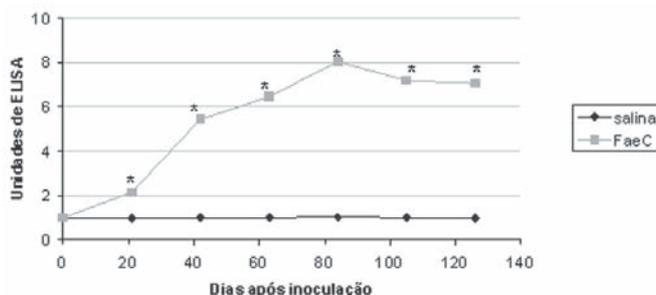


Fig. 4. Resposta imune apresentada em Unidades de ELISA de camundongos inoculados com a vacina de proteína recombinante FaeC e do grupo controle (salina). Asteriscos representam diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.

As diferentes cepas de *E. coli* BL21(DE3) foram transformadas com o plasmídeo pAE/*faeC* e colônias transformadas foram utilizadas para inocular meio líquido. No momento adequado procedeu-se a indução da expressão da proteína recombinante através da adição de IPTG, ou NaCl no caso da cepa BL21(DE3)SI. Amostras coletadas após 4 horas de indução revelaram que a proteína FaeC foi expressa pelas 4 cepas de *E. coli* BL21, porém, codon Plus e pLysS apresentaram uma banda mais evidente. Observou-se que a transcrição da proteína FaeC não foi induzida por IPTG ou NaCl (cepa SI) pois esta já estava presente em níveis elevados antes da indução. Por apresentar uma banda levemente mais intensa que as demais, optou-se por trabalhar com a cepa pLysS.

Visando a purificação da proteína em maior escala, uma cepa de *E. coli* BL21(DE3) pLysS foi cultivada em um volume de 500 ml de meio. Deste cultivo obteve-se um volume final de 3ml de proteína purificada. A quantificação feita pelo método de microtitulação de Bradford revelou uma concentração de 1,2mg/ml. Esta quantidade de proteína foi suficiente para todas as imunizações, bem como para os testes de ELISA e western blot.

A inoculação de camundongos com 2 doses de 100µg cada de pUP310 por via intramuscular foi capaz de induzir uma resposta imune específica contra a proteína FaeC. O teste de ELISA realizado com soro de animais imunizados com a vacina de DNA

apresentou título significativo de anticorpos ($p > 0,05$) a partir do 42º dia após a primeira inoculação, quando comparado com o grupo controle (salina). A resposta imune apresentada pelos camundongos foi monitorada até 210 dias após a primeira inoculação e o título foi aumentando progressivamente com o passar do tempo. Este resultado está ilustrado na Fig. 3.

Camundongos inoculados com a proteína recombinante apresentaram uma resposta imune elevada já a partir do 21º dia após a inoculação. A resposta imune apresentada pelos camundongos foi monitorada até 130 dias após a inoculação e o título de anticorpos foi aumentando progressivamente até o 90º dia após a inoculação. Depois houve uma pequena queda, mantendo-se constante até o 130º dia. Este resultado pode ser visualizado na Fig. 4.

O grupo de animais que recebeu a vacina comercial constituída por bacterina de *E. coli*, portadora do antígeno K88, não apresentou anticorpos detectáveis contra a proteína FaeC recombinante.

DISCUSSÃO

Neste trabalho, buscou-se estudar métodos de imunização visando a produção de anticorpos que impeçam a adesão da fímbria K88 ao epitélio intestinal, como uma alternativa para evitar a colonização de *Escherichia coli* enterotoxigênica ao intestino delgado. A primeira estratégia de imunização utilizada para atingir este objetivo foi clonar o gene *faeC* contendo a seqüência de Kozak em um vetor de expressão em eucarioto, e inocular camundongos com esta vacina de DNA. Este plasmídeo recombinante construído (pUP310), foi capaz de induzir resposta imune contra FaeC. O título de anticorpos foi significativo a partir do 42º dia após a inoculação, quando comparado com o grupo controle (salina). A resposta imune apresentada pelos camundongos foi monitorada até 210 dias após a inoculação e o título foi aumentando progressivamente com o passar do tempo.

Este mesmo gene já havia sido testado em vacina de DNA sem a inclusão da seqüência de Kozak, e não houve indução de resposta imune detectável em camundongos imunizados com esta vacina (dados não apresentados). Esta nova versão que utiliza o gene com uma adenina na posição -4 e uma guanina na posição +1 em relação ao códon de iniciação (seqüência de Kozak) mostrou-se eficaz, sugerindo que a seqüência de Kozak é realmente importante para a tradução desta proteína em células eucarióticas, como já havia sido demonstrado para outros antígenos (Kozak 1986, Lewin 1997, Vervoort et al. 2000). Porém, não podemos atribuir esta diferença unicamente à seqüência de Kozak, pois no primeiro experimento foi utilizado o vetor pcDNA3 (Invitrogen), e neste o vetor pTarget (Promega), embora ambos utilizem o mesmo promotor para expressão em células eucarióticas.

Com o objetivo de testar uma outra forma de imunização, o gene *faeC* foi clonado em um vetor de expressão em *E. coli*. A clonagem do *faeC* no vetor pAE resultou na fusão da proteína FaeC à seqüência de 6 resíduos de histidina. Estes aminoácidos possuem afinidade com íons de níquel, presentes na resina permitindo assim sua ligação à resina. As proteínas que não apresentam cauda de histidina são removidas nos processos de lava-

gens. As que têm cauda de histidina são eluídas da resina por pH ácido ou por imidazol, visto que ambos competem com as histidinas pelos íons de níquel. No caso de tampões com pH ácido, a eluição acontece, pois os íons de hidrogênio em maior quantidade que os íons de níquel, se ligam à histidina desfazendo a ligação entre esta e o níquel.

Camundongos que receberam duas doses com 100 µg de FaeC recombinante apresentaram uma resposta imune elevada, atingindo 8 unidades de ELISA aos 90 dias após a primeira inoculação, e mantendo-se elevada até o final do experimento aos 130 dias após a primeira inoculação. Comparando os dois métodos de imunização, a resposta imune foi superior com a vacina de subunidade do que com a vacina de DNA, porém com a segunda, o título ainda continuava em ascensão no final do experimento. A intensidade da resposta imune obtida com a vacina de DNA contendo o gene *faeC* foi similar à encontrada por Turnes et al. (1999), que imunizaram camundongos com uma vacina de DNA contendo o gene que codifica para a subunidade principal da fímbria K88 de ETEC, a proteína denominada FaeG.

Experimentos realizados por Sun et al. (2000) demonstraram que a subunidade FaeG é a responsável pela aderência da bactéria a receptores localizados nos enterócitos, e que anticorpos anti-FaeG são capazes de inibir a adesão. No entanto, estes autores não descartaram a possibilidade da proteína FaeC também ter um papel importante pois esta está localizada na extremidade da fímbria. Em *E. coli* enterotoxigênica que causa diarreia em humanos, PapI, a menor subunidade é responsável pela adesão da bactéria (Jacobs et al. 1987). A organização gênica deste operon é parecida com a do K88, desta forma FaeC também poderia participar na adesão da fímbria K88 ao epitélio intestinal. Os resultados obtidos neste estudo com FaeC demonstram que esta proteína é imunogênica. Estudos estão sendo realizados no momento para demonstrar se anticorpos anti-FaeC conseguem bloquear a adesão de *E. coli* K88 aos enterócitos de suínos. Caso esta hipótese se confirme, este antígeno passa a ser o candidato ideal para uma vacina de subunidade, pois existe pouca variabilidade entre cepas, o que não ocorre com o FaeG que apresenta as variantes k88 ab, ac e ad (Mooi et al. 1984).

Diversos trabalhos demonstraram que genes que tiveram seus códons de iniciação antecidos pela seqüência de Kozak tiveram sua expressão aumentada de 10 a 50 vezes (Kozak 1986, Lewin 1997, Vervoort et al. 2000). Nossos resultados levam a crer que FaeC com a seqüência de Kozak também teve sua tradução aumentada dezenas de vezes, concordando com as citações acima.

Tanto a imunização com DNA como a de subunidade testados neste estudo foi capaz de desencadear resposta imune significativa contra o antígeno de interesse, porém a vacina de DNA apresentou resposta menos intensa que a vacina de subunidade. Combinação de uma dose com vacina de DNA, e um reforço com proteína purificada poderia ser uma estratégia para obter uma resposta imune elevada a um custo mais reduzido, como foi demonstrado por Barnett et al. (2002).

Para aumentar a resposta imune induzida apenas pela vacina de DNA, outras estratégias poderiam ser utilizadas. Estudos rea-

lizados com uma vacina de DNA expressando uma proteína de superfície de *Anaplasma marginale* demonstraram que há um aumento da população de células efectoras e de memória, quando esta imunização for antecedida por uma vacina de DNA contendo o gene que codifica para o ligante da tirosina kinase 3 de fígado (Mwangi et al. 2002). Outros adjuvantes ou co-estimuladores também poderiam ser testados.

Cox et al. (2002), avaliou imunização oral de suínos com a fimbria K88 solubilizada. Os animais que possuíam o receptor intestinal para a fimbria K88 produziram imunoglobulinas predominantemente do tipo IgA. A indução de resposta imune de mucosa é uma das vantagens da imunização oral, quando se busca proteção contra colibacilose suína. No trabalho que desenvolvemos, testamos uma vacina de subunidade com FaeC que é componente da fimbria K88. Esta vacina seria utilizada nas fêmeas gestantes, visando a produção de anticorpos que passariam via colostro para os leitões, protegendo-os contra a infecção causada por ETEC. A vacina de subunidade FaeC que testamos em camundongos foi capaz de induzir uma resposta imune bastante elevada. Este resultado nos encoraja a realizar experimentos em porcas, com desafio dos leitões amamentados por estes animais imunizados, visando avaliar a capacidade de proteção contra diarreia nestes leitões.

Yokomizo et al. (2002) desenvolveram um imunoadjuvante de mucosa a partir de uma enterotoxina (LT) de *E. coli*. Esta construção foi testada com três antígenos diferentes e administrada por via intranasal. Um destes antígenos era uma proteína recombinante de *E. coli* e, nesta, o imunoadjuvante foi capaz de aumentar o título de imunoglobulinas IgA na mucosa. Este imunoadjuvante parece ser uma ótima alternativa quando se objetiva produção de anticorpos de mucosa, como é o caso da vacina de subunidade FaeC que busca proteger suínos contra colibacilose suína.

Animais inoculados com a vacina comercial contendo a bacterina de *E. coli* portadora do antígeno K88 não apresentaram títulos de anticorpos detectáveis contra a proteína FaeC recombinante. Este fato pode ser resultante da pouca quantidade de FaeC presente na composição desta vacina, já que esta é uma proteína pequena e está presente apenas na extremidade das fimbrias íntegras. Muitas das fimbrias são quebradas durante o cultivo e processamento da vacina, reduzindo a quantidade de FaeC na vacina comercial. Portanto, este resultado já era esperado.

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que o pUP310, um plasmídeo que contém o gene *faeC* com a seqüência de Kozak, o qual codifica a menor subunidade fimbrial de *Escherichia coli* K88, é capaz de induzir a produção de anticorpos em camundongos. A proteína recombinante FaeC também mostrou-se altamente imunogênica. Ambas as estratégias de imunizações apresentam potencial para estimular uma resposta imune protetora contra colibacilose suína caso seja demonstrado que anticorpos anti-FaeC sejam eficazes no bloqueio da adesão de *E. coli* Enterotoxigênica aos receptores intestinais de suínos.

REFERÊNCIAS

Anônimos 14.1.2002. Evolução da suinocultura. <http://www.porkworld.com.br>

- Babiuk L.A., Babiuk S.L., Loehr B.I. & Hurk S.D.L. 2000. Nucleic acid vaccines: research tool or commercial reality. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 76:1-23.
- Bakker D., Willemsen P.T.J., Willems R.H., Huisman T.T., Mooi F.R., Oudega B., Stegehuis F. & Graaf F.K. 1992. Identification of minor fimbrial subunits involved in biosynthesis of K88 fimbriae. *J. Bacteriol.* 174(20):6350-6358.
- Barnett S.W., Rajasekar S., Legg H., Doe B., Fuller D. H., Haynes J. R., Walker C.M. & Steimer K.S. 2002. Vaccination with HIV-1 gp120 DNA induces immune responses that are boosted by a recombinant gp120 protein subunit. *Vaccine* 15:869-873.
- Broeck W.V., Den Cox E., Oudega B. & Goddeeris B.M. 2000. The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors. *Vet. Microbiol.* 71:223-244.
- Choi C. & Chae C. 1999. Genotypic prevalence of F4 variants (ab, ac, and ad) in *Escherichia coli* isolated from diarrheic piglets in Korea. *Vet. Microbiol.* 67:307-310.
- Cox E., Stede Y.V., Verdonck F., Snoeck V., Broeck W.D.V. & Goddeeris B. 2002. Oral immunization of pigs with fimbrial antigens of enterotoxigenic *E. coli*: an interesting model to study mucosal immune mechanisms. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87:287-290.
- Isaacson R.E. 1994. Vaccine against *Escherichia coli* diseases, p.629-647. In: Gyles C.L. (ed.) *Escherichia coli* in Animals. CAB International, Wallingford, UK.
- Jacobs A.A., Venema J., Leeven R., Pelt-Heerschap H. & Graaf, F.K. 1987. Inhibition of adhesive activity of K88 fibrillae by peptides derived from the K88 adhesin. *J. Bacteriol.* 169(2):735-41.
- Jouglard S.D., Medeiros M.A., Vaz E.K., Bastos R.G., da Cunha C.W., Armoa G.R.G. & Dellagostin O.A. 2002. An Ultra-Rapid and Inexpensive Plasmid Preparation Method for Screening Recombinant Colonies. Abstracts American Society for Microbiology, H-71, p.234.
- Lewin B. 1997. *Genes* VI. 6th ed. Oxford University Press, New York. 1260p.
- Lucia Jr.T., Correa, M.N. & Deschamps J.C. 2000. Tópicos em Suinocultura. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- Kozak M. 1981. Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eucariotic ribosomes. *Nucleic Acids Res.* 9:5233-5262.
- Kozak M. 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44:283-292.
- Kozak M. 1997. Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *EMBO Journal* 16:2482-2492.
- Mooi F.R., Van Buuren M., Koopman G., Roosendaal E. & De Graaf F.K. 1984. K88ab gene of *Escherichia coli* encodes fimbria-like protein distinct from the K88ab fimbrial adhesin. *J. Bacteriol.* 159:482-487.
- Mooi F.K. & Graaf F.K. 1985. Molecular biology of fimbriae enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Current Topics Microbiol. Immunol.* 118:119-138.
- Mwangi W., Brown W.C., Lewin H.A., Howard C.J., Hope J.C., Baszler T.V., Caplazi P., Abbott J., Palmer G.H. 2002. DNA-encoded fetal liver tyrosine kinase 3 ligand and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor increase dendritic cell recruitment to the inoculation site and enhance antigen-specific CD4 (+) T cell responses induced by DNA vaccination of outbreed animals. *J. Immunol.* 7:3837-3846.
- Oudega B. & Graaf F.K. 1988. Genetic organization and biogenesis of adhesive fimbriae of *Escherichia coli*. *Antoine van Leeuwenhoek* 54:285-299.
- Qiagen 1999. The QIA Expressionist Kit Manual, Alemanha.
- Sambrook J. & Russel D.W. 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Silva C.L. 1997. O impacto sobre o controle das doenças infecciosas. *Biocologia, Ciência & Desenvolvimento* 3:32-34.

- Sobestiansky J., Barcellos D., Mores N., Carvalho L.F. Oliveira S. Moreno A.M. & Roehle P.M. 1999. Patologia e Clínica Suína. Art. 3, Impressos Especiais, Goiânia.
- Straw E.B., D'Allaire S., Mengeling L.W. & Taylor J.D. 1999. Diseases of Swine. 8th ed. Iowa State University Press, Ames.
- Sun R., Anderson T.J., Erickson A .K. Nelson E.A. & Francis D.H. 2000. Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K88ac to Its receptor, intestinal mucin-type glycoproteins, by a monoclonal antibody directed against a variable domain of the fimbria. *Infect. Immunity* 68 (6):3509-3515.
- Turnes C.G., Aleixo J.A., Monteiro A.V. & Dellagostin O.A. 1999. DNA inoculation with a plasmid carrying the *faeG* adhesin gene of *Escherichia coli* K88ab induced immune responses in mice and pigs. *Vaccine* 17:2089-2095.
- Vervoort E.B., Ravestein A.V., Peij N.N.M.E.V., Heikoop, J.C., Haastert P.J.M.V., Verheijden G.F. & Linskens M.H.K. 2000. Optimizing heterologous expression in *dictyostelium*: importance of 5' codon adaptation. *Nucleic Acids Res.* 28:2069-2074.
- Yokomizo Y., Watanabe F., Imada Y., Inumaru S., Yanaka T. & Tsuji T. 2002. Mucosal immunoadjuvant activity of the log toxic recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin produced by *Bacillus brevis* for the bacterial subunit or component vaccine in pigs and cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87:291-300.