

EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE QUIMERA DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *M. hyopneumoniae* EM *Pichia pastoris*

MOTTA, Maria Lorenza Leal¹ (mah.lorenza.leal@gmail.com); **GOMES, Charles Klazer**² (charlesklazer@hotmail.com); **MARCHIORO, Silvana Beutinger**² (silmarchioro@hotmail.com);

¹ Discente do curso de Biotecnologia da UFGD - Dourados: PIBIC/CNPq;

² Mestre pela Universidade Federal de Pelotas – Pelotas.

³ Dra, Professora Adjunta, Faculdade de Ciências da Saúde da UFGD - Dourados;

Estudos sobre a produção de proteínas recombinantes tem despertado, cada vez mais, interesse em diversas áreas com vastas aplicações. Dentre estas, a área da saúde tem explorado esta ferramenta extensivamente e com maior aplicabilidade. A pneumonia enzoótica suína (PES), causada pela bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae*, está entre as doenças infecciosas de maior impacto na suinocultura mundial, tendo um alto valor agregado sobre o caráter econômico deste tipo de produção. O controle desta doença é feito principalmente pela utilização de vacinas importadas compostas por células mortas de *M. hyopneumoniae*, que apresentam elevado custo de produção e proporcionam apenas uma proteção parcial. Assim, faz-se necessária a busca de novas alternativas para a profilaxia da PES com maior eficiência. Este trabalho permitiu a expressão, em *Pichia pastoris*, de uma proteína quimérica recombinante composta por 3 antígenos de *M. hyopneumoniae* fusionados a um adjuvante (LTB), a qual serviu como um modelo para a padronização de um novo sistema de expressão de proteínas recombinantes na UFGD. Este sistema de expressão possui duas vantagens que sobressai a utilização da *Escherichia coli*: a capacidade para secretar proteínas que podem ser purificados de forma mais fácil e de possuir modificações pós-traducionais necessárias à sua funcionalidade. O gene sintético contendo os três antígenos de *M. hyopneumoniae* (P97R1, P42 e NrdF), associado a um adjuvante de mucosa (LTB), foi clonado no vetor de expressão pPICZαB em *P. pastoris*. A seleção das colônias recombinantes de *P. pastoris* (transformantes) com expressão positiva foi realizada através de *Colony blot*. Após esta etapa, fez-se a caracterização dos antígenos expressos em *P. pastoris*. Observou-se que, ao realizar a digestão dos clones recombinantes, ocorreu a liberação de um fragmento que corresponde ao tamanho do gene. As colônias de *P. pastoris* foram transformadas e crescidas em meio YPDS com zeocina. O *pellet* e o sobrenadante do cultivo de inúmeros clones foram submetidos a teste de expressão através de *Dot blot*, destes foram selecionados 5 clones que apresentaram uma maior expressão. Os clones que apresentaram uma maior expressão passaram pelo processo de caracterização das proteínas expressas por *Western blot*. Pode-se observar a eficiência da clonagem e expressão da quimera recombinante em 4 das 5 colônias testadas. Ao comparar o tamanho da proteína expressa em *P. pastoris* com a proteína expressa em *E. coli* pode-se concluir uma variação considerável entre as duas. Sendo assim, conclui-se que a expressão da proteína quimérica em *P. pastoris* foi realizada com sucesso. Isto demonstra que este sistema de expressão em eucarioto tem um grande potencial e possibilitou uma nova ferramenta alternativa em estudos e produção de proteínas recombinantes de diferentes microrganismos das mais diversas áreas, colaborando desta forma com as demais linhas de pesquisa da unidade.

Palavra-chave: Proteína recombinante. *Pichia pastoris*. *M. hyopneumoniae*.

Agradecimentos: Ao programa de bolsas de iniciação científica e ao CNPq pelo auxílio financeiro.