

RESPOSTA IMUNE CELULAR DE SUÍNOS IMUNIZADOS COM O ANTÍGENO RECOMBINANTE P42 DE *Mycoplasma hyopneumoniae*

SÉRGIO JORGE¹; NATASHA RODRIGUES DE OLIVEIRA²; CHARLES GOMES KLAZER²; ANDRESSA FISCH²; SILVANA BEUTINGER MARCHIORO²; ODIR ANTONIO DELLAGOSTIN³

¹Faculdade de Veterinária – PPGV - UFPEL – sergiojorgevet@hotmail.com

²Lab. de Vacinologia - Núcleo de Biotecnologia – CDTec- UFPEL

³Núcleo de Biotecnologia – CDTec- UFPEL – odirad@terra.com.br

1. INTRODUÇÃO

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente causador da pneumonia enzoótica suína (PES); doença respiratória crônica que acomete animais de produção em todo mundo (MAES et al, 2008). A PES é caracterizada por alta morbidade, baixa mortalidade, decréscimo nas taxas de conversão alimentar e retardo no crescimento dos suínos, causando consideráveis perdas econômicas durante o processo produtivo. As vacinas utilizadas atualmente são compostas por células inteiras da bactéria inativadas (bacterinas), que são capazes de reduzir os sinais clínicos e as lesões pulmonares em te 50%, porém não eliminam o estado de portador (LIN et al., 2003). Em trabalhos relatados anteriormente, não foi encontrado uma correlação entre a produção de anticorpos específicos produzidos pelas vacinas comerciais e a proteção contra *M. hyopneumoniae* (DJORDJEVIC et al, 1997). Alguns estudos têm demonstrado que a resposta imune celular pode ser importante no controle da infecção (THACKER et al., 2000).

Nosso grupo de pesquisas produziu 35 proteínas recombinantes secretadas (SIMIONATTO et al., 2009; SIMIONATTO et al., 2010; SIMIONATTO et al., 2012) e 6 proteínas recombinantes transmembranas (MARCHIORO et al., 2012). Algumas destas proteínas apresentaram potencial para serem usadas como antígenos vacinais em suínos, onde se destacou a chaperona molecular DnaK P42 (proteína de choque térmico) (GALLI et al., 2012; SIMIONATTO et al., 2012).

O presente trabalho avaliou de forma quantitativa a expressão das citocinas IL-10, IL-4 e Interferon- γ em suínos imunizados com o antígeno recombinante P42 (MHP0067) em suínos em granja comercial de produção visando o desenvolvimento de uma vacina mais eficiente contra a PES.

2. METODOLOGIA

2.1 Desenho experimental e formulações vacinais. Para realização do experimento, suínos com 21 dias de idade (não vacinados para PES) foram gentilmente fornecidos por uma granja comercial na zona rural do município de Piratini – RS, com status “positiva” para PES (Kit HerdChek[®] *Mycoplasma hyopneumoniae* IDEXX e PCR). Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais: grupo 1, 8 leitões imunizados com Montanide[®] (controle negativo); grupo 2, 8 leitões imunizados com bacterina comercial Respisure[®]; grupo 3, 8 leitões imunizados com bacterina comercial + 100 μ g de rP42; grupo 4, 8 leitões imunizados por via IM com 100 μ g de rP42 adsorvidas em Montanide[®] e grupo 5 com 8 leitões imunizados com 100 μ g rP42 ressuspendidas em PBS. Os leitões receberão uma dose única, por via

intramuscular profunda aos 21 dias de idade (dias 1). Amostras de sangue total com anticoagulante foram coletadas através de punção da veia jugular no dias 42 pós-inoculação para cultivo de células mononucleares para avaliação da resposta imune celular.

2.2 Cultivo de leucócitos a partir de amostras de sangue. Após contenção dos animais utilizando laço de contenção para suínos, 10 ml de sangue total foram coletados da veia jugular em tubos vacutainer com EDTA e mantidos sob refrigeração até o processamento em laboratório. O sangue foi centrifugado a 1500 rpm por 20 minutos, a capa de leucócitos foi coletada e tratada com solução de cloreto de amônio e homogeneizada por inversão, após uma nova centrifugação a 1500 rpm por mais 10 minutos e descartou-se o sobrenadante. O *pellet* foi suspenso em 5 ml de meio de cultivo celular DMEM (Meio Basal Eagle modificado por Dulbecco) e centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspenso em 2 mL de meio DMEM acrescido com 10% de soro fetal bovino. Foi realizada pool das células dos animais do mesmo grupo. A contagem de leucócitos foi realizada utilizando azul de tripan e foram semeadas 10^6 células em placa de cultivo celular de 24 cavidades em triplicata. O controle positivo foi estimulado com $7\mu\text{g}/\text{well}$ de concanavalina (ConA), controle negativo estimulado com PBS e as amostras com $15\mu\text{g}$ de P42. Foi coletado o sobrenadante 24 hs pós estímulo e congelado em -70° .

2.3 Avaliação de resposta imune celular. A avaliação da expressão das citocinas IL-10, INF- γ e IL-4, mediante estímulo com a rP42, foram realizadas a partir do sobrenadante do cultivo celular descrito no item 2.2. Para a quantificação destas citocinas, foi realizado teste imunoenzimático utilizando kits comerciais: ELISA Invitrogen™ Swine Interleukin-10, Swine Interleukin-4 e Swine INF- γ kit, conforme recomendação do fabricante.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora dos mecanismos de patogenicidade o *M. hyopneumoniae* não estejam completamente elucidados, alguns autores relatam a importância da indução da resposta imune celular no controle da infecção (THACKER et al., 2000). Neste estudo nós avaliamos a expressão das citocinas IL-4, IL-10 e Interferon- γ em suínos naturalmente expostos ao *M. hyopneumoniae* em granja comercial de produção imunizados em formulações vacinais compostas com o antígeno rP42.

No presente trabalho, os níveis da IL-10 detectados em cultivo de células mononucleares nos grupos de animais imunizados com a rP42 foi maior quando comparadas com os demais grupos (FIGURA 1). A associação da rP42 adsorvida em adjuvante oleoso (Montanide®), potencializou a expressão da IL-10 quando comparada com o grupo imunizado em a rP42 sem adjuvante, e também apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparada com todos os outros grupos, inclusive o grupo imunizado com a vacina comercial (RespisureOne®). A IL-10 tem ação regulatória da resposta imune: inibe a síntese de citocinas produzidas por macrófagos e inibe a proliferação de células T e inibe a liberação de moduladores dos mastócitos. Devido a sua ação inibitória. A IL-10 pode ter um papel chave no controle das lesões pulmonares da PES, pois a resposta inflamatória é um dos fatores responsáveis pelas lesões “hepatização” e colapso de lobos pulmonares característicos da doença.

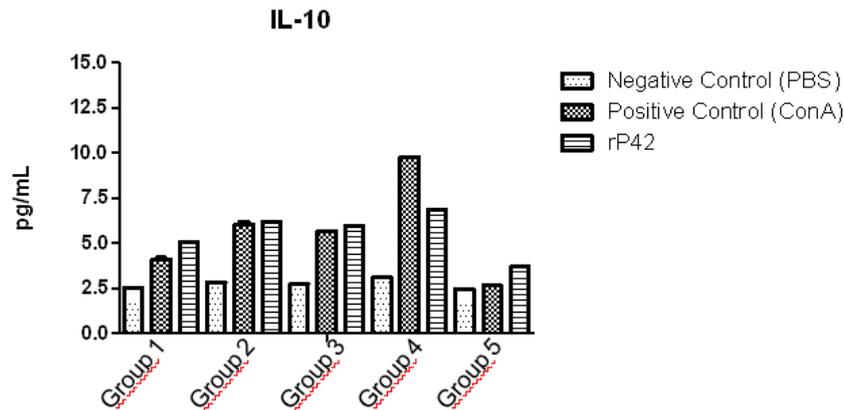


FIGURA 1 – Expressão de IL-10 detectado no sobrenadante de cultivo de células mononucleares de 5 grupos de suínos imunizados em diferentes formulações vacinais compostas: Grupo 1 – PBS, Grupo 2 – RespiSureOne, Grupo 3 – RespiSure + P42, Grupo 4 – RespiSureOne + P42 e Grupo 5 – PBS + P42. Os maiores valores de IL-10 foram detectados no grupo imunizado com o antígeno rP42 + Montanide; tendo diferença estatística quando comparada com todos os outros grupos estimulados com a rP42 ($p < 0,005$), indicando que este antígeno adsorvido em adjuvante oleoso induz altos níveis de IL-10.

As principais funções do Interferon- γ estão relacionadas a ativação de macrófagos e na participação no aumento da expressão do MHC. Nos achados quantitativos da expressão do Interferon- γ encontrados entre os grupos, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos imunizados com a rP42 + Montanide[®] em relação ao controle negativo. Também foi observado diferença estatística ($p < 0,05$) na expressão do Interferon- γ entre os grupos imunizados com a bacterina comercial (RespiSure[®]One) e o grupo imunizado com bacterina comercial + rP42 quando relacionadas com os respectivos controles negativos (FIGURA 2). Neste estudo não houve diferença significativa da expressão da IL-4 entre os grupos imunizados (dados não mostrados).

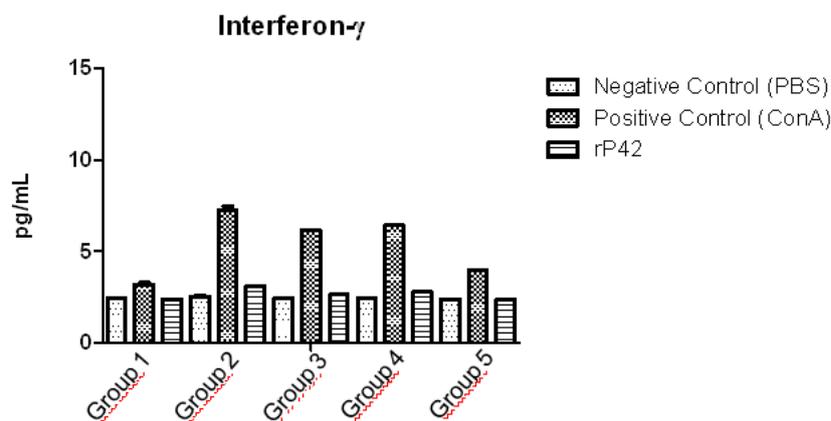


FIGURA 2 – Expressão de Interferon- γ detectado no sobrenadante de cultivo de células mononucleares de 5 grupos suínos imunizados em diferentes formulações vacinais compostas: Grupo 1 – PBS, Grupo 2 – RespiSureOne, Grupo 3 – RespiSure + P42, Grupo 4 – RespiSureOne + P42 e Grupo 5 – PBS + P42. O valores de Interferon- γ foram maiores nos grupos 3 e 4, indicando que o antígeno rP42 adsorvido em de adjuvante estimula uma maior expressão de Interferon- γ .

4. CONCLUSÕES

Por meio deste trabalho foi possível concluir que a proteína recombinante rP42 adsorvido em adjuvante oleoso induz a expressão em altos níveis de IL-10 e Interferon- γ em cultivo de células mononucleares quando comparadas com outros grupos imunizados com diferentes formulações vacinais. Estudos futuros são necessários para avaliar o papel deste antígeno na redução das lesões pulmonares e na proteção sistêmica contra a Pneumonia Enzootica Suína.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DJORDJEVIC, S. P.; EAMENS, G. J.; ROMALIS, L. F.; NICHOLLS, P. J.; TAYLOR V.; CHIN J. Serum and mucosal antibody responses and protection in pigs vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with vaccines containing a denatured membrane antigen pool and adjuvant. **Australian Veterinary Journal**, v.75, n.7, p.504-511, 1997.
- GALLI, V.; MARCHIORO, S. B.; FISCH, A.; GOMES, C. K.; CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Immunisation of mice with *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens P37, P42, P46 and P95 delivered as recombinant subunit or DNA vaccines. **Vaccine**, v.31, p.135-140, 2012.
- LIN, J. H.; WENG, C. N.; LIAO, C. W.; YEH, K. S.; PAN, M. J. Protective effects of oral microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine prepared by co-spray drying method. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.65, n.1, p.69-74, 2003.
- MAES, D.; SEGALES, J.; MEYNS, T.; SIBILA, M.; PIETERS, M.; HAESBROUCK, F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. **Veterinary Microbiology**, v.126, n.4, p.297-309, 2008.
- MARCHIORO, S. B.; MAES, D.; FLAHO, B.; PASMANS, F.; DEL POZO SACRISTÁN, R.; VRANCKX, K.; MELKEBEEK, V.; COX, E.; WUYTS, N.; HAESBROUCK, F. Local and systemic immune responses in pigs intramuscularly injected with an inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine. **Vaccine**, v.31, p.1305-1311, 2013.
- SIMIONATTO, S.; MARCHIORO, S. B.; GALLI, V.; BRUM, C. B.; KLEIN, C. S.; REBELATTO, R.; SILVA, E. F.; BORSUK, S.; CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Immunological characterization of *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant proteins. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.35, p.209-216, 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 Expression and Purification**, v.69, p.132-136, 2010.
- SIMIONATTO, S.; MARCHIORO, S. B.; LUERCE, T. D.; HARTWIG, D. D.; MOREIRA A. N.; DELLAGOSTIN, O. A. Efficient site-directed mutagenesis using an overlap extension-PCR method for expressing *Mycoplasma hyopneumoniae* genes in *Escherichia coli*. **Journal of Microbiological Methods**, v.7, p.101-105, 2009.
- THACKER, E. L.; THACKER, B. J.; KUHN, M.; HAWKINS, P. A.; WATERS, W. R. Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v.61, n.11, p.1384-1389, 2000.