

AVALIAÇÃO DA INTERLEUCINA-10 NO PLASMA DE SUÍNOS IMUNIZADOS COM ANTÍGENO RECOMBINANTE P42 DE *Mycoplasma hyopneumoniae*

ANA CAROLINA PEITER¹; SÉRGIO JORGE²; ANDRESSA FISCH²; NATASHA RODRIGUES DE OLIVEIRA²; SILVANA BEUTINGER MARCHIORO²; ODIR ANTONIO DELLAGOSTIN³

¹Universidade Federal de Pelotas – acpeiter@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – sergiojorgevet@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – silmarchioro@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - dessafh@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - oliveira_natasha@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – odirad@terra.com.br

1. INTRODUÇÃO

Mycoplasma hyopneumoniae é o patógeno causador da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), doença respiratória crônica que acomete suínos em todo o mundo, causa perdas econômicas e queda nos índices produtivos. Isso se deve ao fato de essa ser uma enfermidade de curso longo e induzir infecção subclínica em considerável número de animais em rebanho positivo (MARCHIORO, 2012).

M. hyopneumoniae é um dos maiores contribuidores para doenças respiratórias em suínos, interagindo com outras infecções, causando danos ao epitélio das vias aéreas do trato respiratório, o que facilita infecções por patógenos secundários (MINION et al., 2004).

Uma característica importante é a plasticidade genômica deste microrganismo, que permite uma alteração considerável de sua estrutura fenotípica, caracterizada principalmente pela mudança de proteínas estruturais de superfície. Isso está relacionado ao curso prolongado da infecção e a dificuldade de desenvolvimento de uma imunidade protetora total (TAJIMA & YAGIHASHI, 1982).

A vacinação e o manejo ambiental são os principais métodos de controle. As vacinas comercialmente disponíveis consistem em bacterinas inativadas que, embora reduzam o grau de lesão pulmonar, são incapazes de prevenir a infecção e a colonização do patógeno (MAES et al., 2008).

O presente estudo tem como objetivo realizar a avaliação quantitativa da interleucina-10 no plasma de suínos imunizados com o antígeno recombinante rP42 mantidos em granja comercial.

2. METODOLOGIA

2.1 Expressão e purificação da proteína recombinante

A sequência codificadora do antígeno P42 foi amplificada por PCR, utilizando DNA extraído de *M. hyopneumoniae* cepa 7448 como molde. O gene resultante foi clonado no vetor pAE, utilizando *E. coli* TOP 10. A expressão da proteína foi induzida por 3 h com 1,0 M de Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). A proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando *Sepharose* (HisTrap™) carregada com níquel.

2.2 Imunização dos suínos e coleta do plasma

Para realização do experimento, suínos com 21 dias de idade (não vacinados para PES) com status “positivo” para PES (Kit HerdChek® *Mycoplasma*

hyopneumoniae IDEXX e PCR), foram divididos em cinco grupos experimentais de 8 animais cada: grupo 1, leitões imunizados com adjuvante oleoso Montanide® (controle negativo); grupo 2, leitões imunizados com a bacterina comercial Respire One®, grupo 3, Respire One + rP42, grupo 4, rP42 adsorvida em Montanide® e grupo 5, leitões imunizados com rP42 ressuspensa em PBS. Os leitões receberam uma dose de 100 µg no dia 0 de cada formulação vacinal. Amostras de 5 mL sangue total sem anticoagulante foram coletadas através de punção da veia jugular no dia 42 pós-inoculação para coleta do plasma e avaliação da expressão da IL-10.

2.3 Detecção de interleucina-10 no plasma

A interleucina-10 dos suínos imunizados foi detectada em pool (8 amostras de cada grupo) das amostras de plasma utilizando ensaio imunoenzimático através do kit Invitrogen® Swine Interleukin-10 (Sw IL-10) ELISA. As amostras foram processadas de acordo com as instruções do fabricante. O plasma foi testado sem diluições e as reações colorimétricas foram medidas utilizando densidade óptica de 450 nm. A leitura foi realizada no equipamento Victor™ X5 2030 Multilabel Reader by Perkin Elmer.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar de as vacinas comerciais disponíveis serem utilizadas mundialmente nas granjas de produção de suínos, elas promovem apenas uma proteção parcial, evidenciando a necessidade de uma nova vacina com eficácia aperfeiçoada. Nesse trabalho, foi avaliada a expressão da interleucina-10 em suínos mantidos em granja comercial de produção imunizados em formulações vacinais compostas com antígeno rP42.

A avaliação desta citocina foi realizada nos animais com 63 dias de idade (42 dias pós imunização). Foram detectados os níveis de IL-10, e após quantificação e análise estatística, os resultados obtidos mostraram diferença estatística entre os grupos Montanide + P42 e PBS + P42 em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), e também entre os grupos Montanide + P42 e PBS + P42 em relação à vacina comercial ($p < 0,05$). O antígeno rP42 induziu melhor resposta imunológica celular em relação ao grupo controle e à vacina comercial atualmente disponível (Figura 1).

Alguns estudos tem demonstrado que a resposta imune celular tem papel importante no controle da infecção (THACKER, 2000). Os efeitos inibitórios da interleucina-10 são importantes devido às suas funções anti-inflamatórias, tendo papel chave na redução das lesões pulmonares causadas pela resposta à infecção de *M. hyopneumoniae*. Além disso, a interleucina-10 é um fator que desativa macrófagos e tem um papel crucial nas reações da imunidade inata e da imunidade celular. Tem por função a inibição da produção de IL-12 e TNF pelos macrófagos, suprimindo a sua função inflamatória, e a ativação de linfócitos B (MOORE et al., 2001).

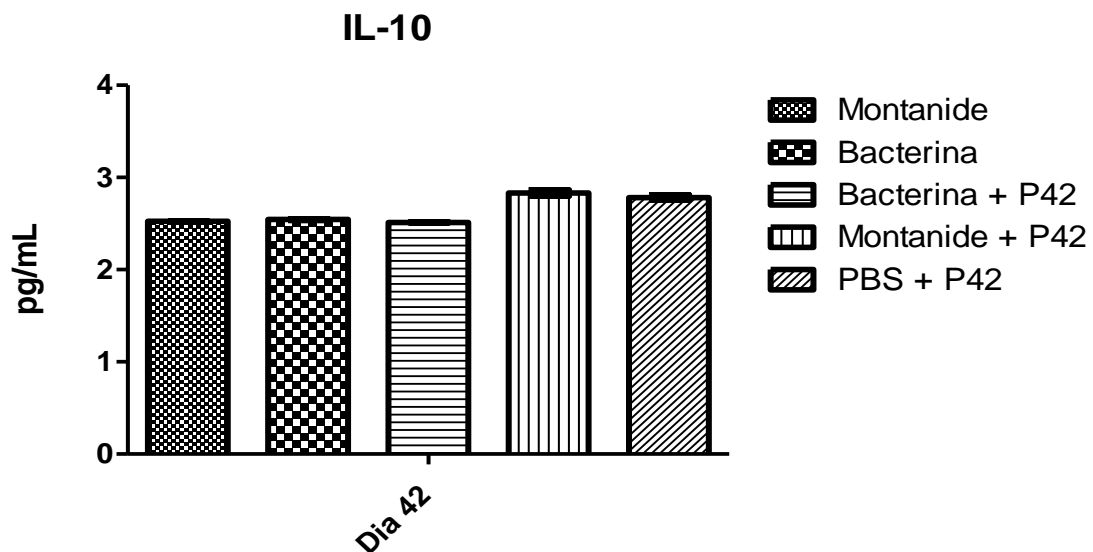


Figura 1: expressão da IL-10 em suínos, no dia 42 pós-inoculação, induzida por adjuvante oleoso Montanide® (controle negativo); bacterina comercial Respisure One®, Respisure One + rP42, rP42 adsorvida em Montanide® e rP42 ressuspendida em PBS.

4. CONCLUSÕES

A partir do presente estudo, pode se inferir que o aumento da expressão da IL-10 em suínos imunizados com a proteína recombinante P42 teve diferença estatística na expressão da IL-10 em relação aos grupos controles e à vacina comercial. Estudos futuros são necessários para determinar o papel da rP42 na indução da proteção contra pneumonia enzoótica suína, através da resposta imune celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MAES, D.; SEGALES, J.; MEYNS, T., et al. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. **Veterinary Microbiology**, v.126, n.4, p.297-309, 2008.

MARCHIORO, S.B.; MAES, D., FLAHOU, B., PASMANS, F., SACRISTÁN, R.D.P., 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.

SIBILA, M.; PIETERS, M.; MOLITOR, T.; MAES, D.; HAESBROUCK, F.; SEGALÉS, J. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* e infection. **The Veterinary Journal**, v.181, p.221– 231, 2009.

MOORE, K.W., DE WAAL MALEFYT, R., COFFMAN, R.L., O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.** v.19 p.683–765, 2001.

TAJIMA, M., YAGIHASHI, T. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. **Infection and Immunity.** V.37, p.1162-1169. 1982.

MINION F. C., LEFKOWITZ E. J., MADSEN M.L., CLEARY B.J, SWARTZELL S.M., MAHAIRAS G.G. The Genome Sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* Strain 232, the Agent of Swine Mycoplasmosis. **Journal of bacteriology,** v.186, n. 21, p.7123–7133. 2004.

THACKER, E.L., THACKER, B.J., KUHN, M., HAWKINS, P.A., WATERS, W.R.. Evaluation of Local and Systemic Immune Responses By Intramuscular Injection Of a *Mycoplasma Hyopneumoniae* Bacterin To Pigs. **Am. J. Vet. Res.** v.61 p.1384-9, 2000.