

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Expressão do mRNA TLR2 em células de lavado broncoalveolar em suínos da raça Piau e de uma linhagem Comercial vacinados contra pasteurelose¹

Katiene Régia Silva Sousa², André Mauric Frossard Ribeiro³, Adriana Costa Oliveira⁴, Simone Eliza Facioni Guimarães⁵, Paulo Sávio Lopes⁵

¹Parte da tese de Doutorado do primeiro autor, financiada pelo CNPq, FAPEMIG, CAPES.

²Departamento de Zootecnia - UFPI, Piauí, Brasil Brasil. e-mail: katiregia@yahoo.com.br

³Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – UFV, Viçosa. Bolsista do CNPq. email: andrewsramones@hotmail.com

⁴Graduação em Zootecnia – UFPI, Piauí. email: dryka_morena@hotmail.com

⁵Departamento de Zootecnia – UFV, Viçosa. Bolsistas INCT. email: sfacioni@ufv.br; pslopes@ufv.br

Resumo: *Pasteurella multocida* é o agente etiológico responsável tanto pela rinite atrófica progressiva (tipo D) quanto pela pneumonia (tipo A) em suínos. Objetivou-se comparar o padrão de expressão gênica do receptor toll like do tipo 2 em células do lavado broncoalveolar em suínos da raça Piau e de uma linhagem Comercial vacinados contra *Pasteurella multocida* tipo D. Foi coletado lavado broncoalveolar de fêmeas da raça local brasileira Piau e de uma linhagem Comercial, em grupos de animais vacinados e não vacinados. A expressão relativa do gene TLR2 foi feita por RT-qPCR usando o sistema de fluorescência SYBR Green. O gene HPRT1 foi utilizado como controle endógeno. As análises foram feitas pelo proc MIXED do software SAS. Não houve diferenças significativas de expressão do TLR2 entre as raças dentro de grupo de vacinação e nem entre os grupos dentro de cada raça, porém, é indispensável mais estudos para o melhor entendimento do controle dos mecanismos imunológicos e fisiológicos para direcionar a seleção genética para melhorar a resposta efetiva a doença.

Palavras-chave: *Pasteurella multocida*, receptor toll like, resistência à doença, suínos

TLR2 mRNA expression in bronchoalveolar fluid cells from Piau breed and Commercial line vaccinated against pasteurellosis

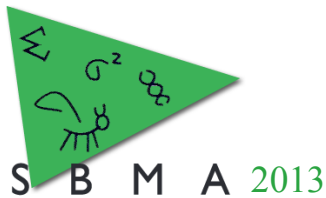
Abstract: *Pasteurella multocida* is a pathogen responsible for both progressive atrophic rhinitis (type D) and pneumonia in swine (type A). The aim of this study was to compare mRNA expression pattern of toll like receptor 6 in bronchoalveolar fluid cells from Piau Brazilian Local breed and Commercial line pigs vaccinated against *Pasteurella multocida* type D. It was collected bronchoalveolar fluid from Piau Brazilian Local breed and Commercial White Line, vaccinated and unvaccinated animals group. The TLR6 gene expression was done by RT-qPCR using SYBR green fluorescence system, using HPRT1 gene as endogenous control. Analyses were performed by MIXED procedures of SAS software. There was no significant difference gene expression of TLR2 between each vaccination group within breeds neither between breeds within each vaccination group; however, it is necessary more studies for better understanding of immune and physiological mechanisms control to produce an effective response to disease challenge.

Keywords: disease resistance, *Pasteurella multocida*, pigs, toll like receptor

Introdução

Pasteurella multocida é uma bactéria Gram negativa e agente patológico responsável tanto pela rinite atrófica progressiva (tipo D) quanto pela pneumonia (tipo A) em suínos e, é considerado um agente complicador dos processos pneumônicos, especialmente aqueles que resultam em pleurite. A doença é caracterizada por atrofia conchal e por vários graus de distorção facial. Os sinais são acompanhados por crescimento lento dos animais de engorda (Haesebrouck et al., 2004).

Os receptores *Toll like* são responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos e orientam o sistema imunológico como responder aos microorganismos invasores, incluindo componentes bacterianos (Dwivedi et al., 2012). Os receptores *Toll like 2* (TLR2) são vitais para o reconhecimento de peptídeo glicano (componente de bactérias Gram-positivas) e lipoproteínas (componentes de bactérias Gram-negativas). Embora, o TLR4 é o melhor receptor de



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

reconhecimento de lipopolissacarídeos, a capacidade de resposta do TLR2 aos lipopolissacarídeos tem sido descrita (Armstrong et al., 2004). Logo, objetivou-se comparar a expressão do mRNA TLR2 em células de lavado broncoalveolar (BALF) de suínos da raça Piau e de uma linhagem Comercial vacinados contra *Pasteurella multocida* tipo D.

Material e Métodos

Os animais foram testados para presença ou ausência do agente patológico por meio de teste sorológico, antes da vacinação e, posteriormente, os animais negativos foram divididos em grupos de não vacinados e vacinados (intramuscular, vacina autógena, adjuvante oleoso, MICROVET, vacinados no 21º dia de vida - 1º dose – e 42º dia de vida- 2º dose da vacina). Aos 90 dias, os animais foram eutanasiados com injeção de pentobarbital sódico 2,5% e foram coletadas amostras de lavado broncoalveolar (10 mL), por meio de procedimento cirúrgico, de leitões fêmeas da raça Piau e de uma linhagem Comercial (6 vacinados e 3 não vacinados de cada grupo genético). As amostras de BALF foram mantidas no gelo e, em seguida, isoladas por centrifugação. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Viçosa.

O RNA foi extraído das células do BALF usando o RNeasy Mini Kit (Qiagen) e a transcrição reversa com SuperScript III/RNaseOUT Enzyme Mix (Invitrogen Life Technologies). A PCR quantitativa em tempo real foi feita usando o SYBR Green no Sistema de Detecção de Sequências ABI Prism 7300 (*Applied Biosystems*). O cDNA de cada amostra foi submetido ao PCR em tempo real, usando o gene TLR2 como alvo e o gene HPRT1 (*hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1*) como controle endógeno, e os resultados obtidos analisados com proc MIXED do software SAS (*Statistical Analysis System*, versão 9.0). Os dados foram apresentados em ΔC_t e a expressão relativa em $2^{-\Delta C_t}$.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos da expressão gênica da TLR2 estão apresentados na Tabela 1, na qual as diferenças estatísticas da comparação entre vacinados e não vacinados dentro do mesmo grupo genético estão reportados assim como entre os grupos genéticos dentro dos grupos vacinados e não vacinados.

Tabela 1. Níveis de expressão gênica (médias em $\Delta C_t \pm$ erro padrão) do gene TLR2 em células do lavado broncoalveolar de suínos da raça Piau (P) e da linhagem Comercial (C) vacinados contra *Pasteurella multocida* tipo D

Grupo	Não vacinados	Vacinados
P	0,47 \pm 0,44 ^{Aa}	1,13 \pm 0,31 ^{Aa}
C	0,43 \pm 0,44 ^{Aa}	0,32 \pm 0,31 ^{Aa}

Diferentes letras sobrescritas indicam diferença estatística ($P < 0,05$) dentro do mesmo grupo de vacinação entre as raças (A ou B) e entre os diferentes grupos de vacinação dentro da mesma raça (a ou b).

Não houve diferença de expressão gênica comparando-se os grupos de vacinação entre as raças (Tabela 1) e nem dentro de raça nos diferentes grupos de vacinação (Tabela 1 e Figura 1). Isto porque a *Pasteurella multocida* tipo D possui potentes estimulantes da resposta imune do hospedeiro, mas não estão necessariamente associados com forte resposta inflamatória, visto que os animais foram vacinados e, não desafiados com o agente patogênico. A baixa expressão do TLR2 pode ser devido a maior afinidade dos lipopolissacarídeos com o TLR4, que tem como consequência a ativação das citocinas e regulação da imunidade inata e adaptativa (Chen et al., 2008; Armstrong et al., 2004).

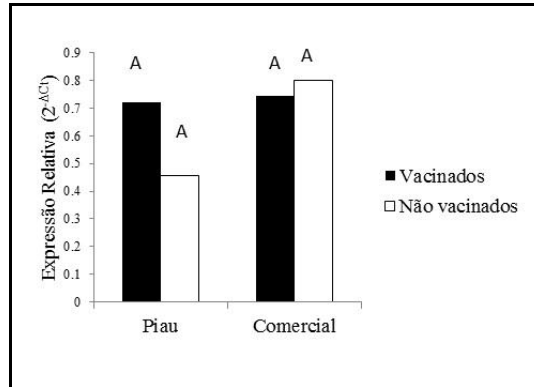


Figura 1 Expressão gênica relativa ($2^{-\Delta C_t}$) para TLR2 entre animais vacinados e não vacinados dentro dos grupos genéticos, Piau e Comercial

As diferenças na produção de moléculas imunológicas, tais como, os TLRs que estão envolvidos no reconhecimento de moléculas associadas aos patógenos tem grande influência na resposta aos patógenos e estão associados com susceptibilidade e resistência às doenças (Lazarus et al., 2002).

Conclusões

Não houve diferenças significativas de expressão do TLR2 entre as raças dentro de grupo de vacinação e nem entre os grupos dentro de cada raça, porém, é indispensável mais estudos para o melhor entendimento do controle dos mecanismos imunológicos e fisiológicos para direcionar a seleção genética para melhorar a resposta efetiva a doença e, simultaneamente, manter o desempenho do animal.

Literatura citada

- Armstrong, L., Medford, R. L., Hunter, J. et al. Differential expression of Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis. **Clinical & Experimental Immunology** 136, 312–319, 2004.
- Chen Z., Cheng Y., Xu Y. et al. Expression profiles and function of Toll-like receptors 2 and 4 in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B patients. **Clinical Immunology** 128, 400–408. 2008.
- Dwivedi V., Manickan C., Binjawadagi B. et al. Evaluation of immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs during early stage of infection under farm conditions. **Virology Journal**, 45, 1-9. 2012.
- Haesebrouck, F., Pasmans, F., Chiers, K. et al. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? **Veterinary Microbiology** 100, 255-268. 2004.
- Lazarus R., Vercelli D., Palmer L.J. et al. Single nucleotide polymorphisms in innate immunity genes: abundant variation and potential role in complex human disease. **Immunology Reviews** 190, 9–25. 2002.