

Efeito da estimulação com antígenos específicos do *Mycobacterium* sp na produção de óxido nítrico pelas células mononucleares de bovinos portadores de tuberculose

Ediane Batista da **SILVA**¹; Arioldo C. **VASCONCELOS-JUNIOR**²; Maria Ivete de **MOURA**³; Marco Augusto Machado **SILVA**³; Eduardo Martins de **SOUSA**⁴; Ana Paula **JUNQUEIRA-KIPNIS**⁴.

Palavras-Chave: Células mononucleares; óxido nítrico; bovinos

INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma das enfermidades mais antigas e até os dias atuais, continua ameaçando, a saúde do homem e a dos animais. Sabe-se que um terço da população mundial está infectada por essa doença e estima-se que a cada ano surgem oito milhões de casos novos, causando três milhões de mortes em humanos.

A tuberculose bovina é causada pelo *Mycobacterium bovis*, o qual provoca grande prejuízo aos rebanhos bovinos, devido às perdas econômicas. Avalia-se que mais de 50 milhões de bovinos ao redor do mundo estejam infectados pelo *M. bovis*, o que resulta em uma perda econômica aproximada de U\$ 50 bilhões.

Um dos componentes da defesa contra a tuberculose é a produção de óxido nítrico (NO) pelas células mononucleares do hospedeiro. O óxido nítrico é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons de nitrogênio e oito de oxigênio, tendo um elétron desemparelhado (BECKMAN & KOPPENOL, 1996). O estímulo da produção de NO de macrófagos e subsequente geração de nitrogênio reativo são mecanismos potentes para a morte micobacteriana (DENIS, 1991), sendo essa molécula o principal mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas (HIBBS, 1988).

A determinação das concentrações de NO em animais naturalmente infectados por *M. bovis* pode colaborar para o entendimento da resposta imune inata e específica a este patógeno. Apesar de ser produzida principalmente por macrófagos residentes e os inflamatórios a estimulação *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) com antígenos específicos de *Mycobacterium* sp pode indiretamente estimular linfócitos efetores a produzirem INF- γ e conseqüentemente ativar os macrófagos contidos no PBMC a produzirem NO.

O objetivo desse trabalho foi quantificar a produção de NO pelas células mononucleares de bovinos infectados com tuberculose, quando estimulados com Ag85, tuberculina e BCG.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização desse experimento utilizou-se 13 bovinos, fêmeas, adultas, da raça Holandesa, as quais foram diagnosticadas positivas à tuberculose, por meio do teste intradérmico de tuberculina e seis animais bovinos controle negativos para tuberculose, analisados também pelo mesmo método.

SILVA, E.B.; VASCONCELOS-JUNIOR, A.C.; MOURA, M.I.; SILVA, M.A.M.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P. Efeito da estimulação com antígenos específicos do *Mycobacterium* sp na produção de óxido nítrico pelas células mononucleares de bovinos portadores de tuberculose. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG - CONPEEX, 3., 2006, Goiânia. **Anais eletrônicos do III Seminário da Pós-Graduação da UFG** [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2006. n.p.

Coletou-se aproximadamente 12 mL de sangue da veia jugular de todos os animais em tubos contendo heparina. O sangue foi devidamente acondicionado, em contato com gelo e transportado para o laboratório de Imunopatologia no IPTSP/UFG.

Isolou-se as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de acordo com o protocolo estabelecido por VESOSOSKY et al. (2004). Sucintamente, 12 ml de sangue total heparinizado foram centrifugado a 2.000 rpm por minuto, durante 20 minutos. O anel leucocitário foi coletado e lavado duas vezes com solução salina a 0,9%. As PBMCs assim isoladas foram tratadas com solução tampão de lise de hemácias (NH_4Cl e KHCO_3) e posteriormente incubadas com diferentes antígenos de *M. bovis* em meio de RPMI.

Utilizou-se 20 $\mu\text{g/ml}$ do antígeno recombinante Ag85, 5 $\mu\text{g/ml}$ de Tuberculina e 10 $\mu\text{g/ml}$ de BCG. As células isoladas foram acondicionadas em estufa de CO_2 a 37°C, durante 72 horas, para avaliação do NO. Após esse período, foram distribuídos 50 μL de cada uma das amostras em quadruplicatas, em uma placa de 96 poços para a avaliação da concentração de NO.

Anteriormente à avaliação da concentração de NO nas placas, fez-se necessário realizar uma curva com diferentes concentrações de NaNO_2 . Acrescentou-se 50 μL de solução de Greiss em cada poço da placa, e após incubação durante 30 minutos a temperatura ambiente, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro com um comprimento de onda de 595nm. Após a leitura da curva padrão, confeccionou-se a equação da reta para obtenção da concentração de NO das amostras. Os dados foram analisados por meio de análise de variância e teste t. Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto à concentração de NO, observou-se que quando o sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de bovinos positivos para tuberculose, foi estimulado pelo antígeno recombinante, o Ag85, encontrou-se valores médios de (5,7208 \pm 3,19) e de (10,1347 \pm 10,49) para o grupo controle, não se observando diferença significativa entre os dois grupos ($p > 0,05$). A distribuição da concentração de NO estimulados pelo Ag85, encontram-se na Figura 1.

A avaliação da produção de NO na presença do antígeno recombinante Ag 85 foi de caráter inovador, não encontrando relatos na literatura. Outra importante observação foi a capacidade das células mononucleares de ambos os grupos de animais produzirem NO. O fato do grupo controle possuir uma média mais elevada de NO em relação ao grupo infectado pode indicar que os macrófagos dos animais infectados encontram-se debilitados pela infecção. Vários trabalhos mostraram que a infecção por micobactérias diminui a ativação dos macrófagos.

Ao se analisar o sobrenadante das culturas de células mononucleares do sangue periférico de bovinos positivos para tuberculose, na presença da tuberculina, houve uma concentração média de NO de 5,7705 \pm 3,11 e de (7,3262 \pm 3,02) encontrada nos animais controle, não havendo diferença significativa entre os dois grupos ($p > 0,05$). Os valores da concentração de NO estão distribuídos na Figura 2.

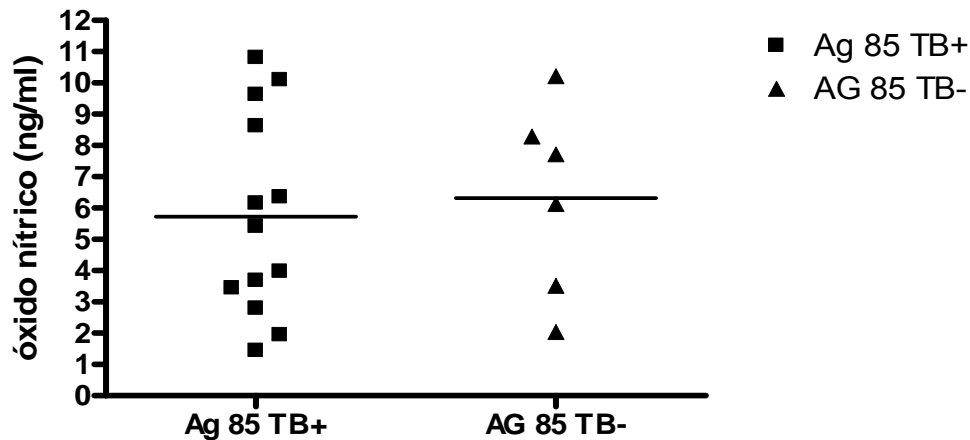


Figura 1. Distribuição da concentração de óxido nítrico, estimulados com Ag85, em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de bovinos positivos para tuberculose, oriundos do Estado de Goiás, agosto de 2006.

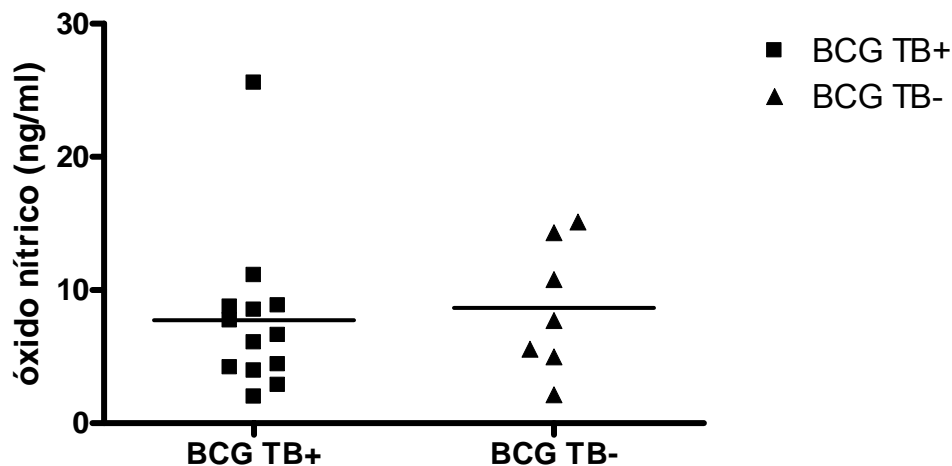


Figura 2. Distribuição da concentração de óxido nítrico, estimulados com tuberculina, em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de bovinos positivos para tuberculose, oriundos do Estado de Goiás, agosto de 2006.

Quanto à produção de NO pelas PBMC, estimulados pelo Bacilo de Calmette-Guérin inativado (BCG), (Figura 3) não houve diferença significativa entre os animais tuberculose positivos ($7,7343 \pm 5,99$) comparados ao grupo controle ($8,6574 \pm 4,90$) $p > 0,05$. De acordo com trabalho realizado por DENIS et al. (2005) os macrófagos bovinos liberaram baixa quantidade de NO quando se realiza infecção experimental com BCG. Entretanto, quando houve o pré-tratamento do macrófago com $\text{INF-}\gamma$ houve aumento da liberação de NO em resposta ao BCG e ao *M. bovis*. CARPENTER et al. (1998) avaliaram a produção de NO de macrófagos isolados de bovinos imunizados com BCG e o grupo não imunizado (controle). Os autores observaram que a maior concentração de NO esteve associada a maior secreção de $\text{INF-}\gamma$. Além disso, quando houve tratamento das culturas com inibidor de NO, houve redução do nível dessa molécula, sem afetar a atividade metabólica do BCG, sugerindo que a síntese do NO pode constituir uma parte integral da resposta ao antígeno do *M. bovis*.

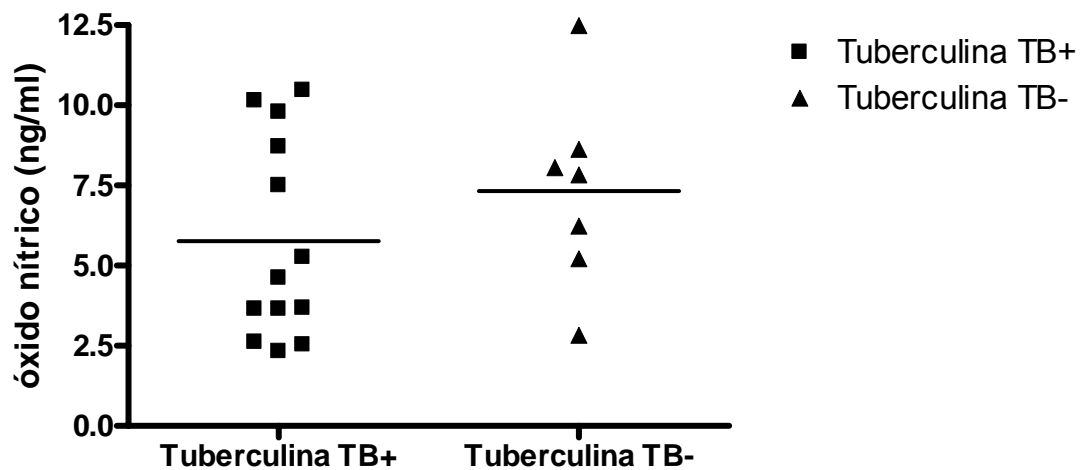


Figura 3. Distribuição da concentração de óxido nítrico, estimulados com BCG, em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de bovinos positivos para tuberculose, oriundos do Estado de Goiás, agosto de 2006.

A avaliação da produção de NO na presença de antígenos, apesar de ser de caráter inovador, pois pôde-se observar a produção de NO pelas células mononucleares dos bovinos, não foram capazes de discriminar animais reatores ao teste intradérmico de tuberculina dos não reatores.

CONCLUSÃO

A produção de NO em bovinos naturalmente infectados por tuberculose apresenta-se elevada na presença Ag85, tuberculina e BCG, no entanto, não há discriminação entre os mesmos. Os antígenos Ag85, tuberculina e BCG estimulam a produção de NO nos animais positivos e negativos para o teste de tuberculose.

SILVA, E.B.; VASCONCELOS-JUNIOR, A.C.; MOURA, M.I.; SILVA, M.A.M.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P. Efeito da estimulação com antígenos específicos do *Mycobacterium* sp na produção de óxido nítrico pelas células mononucleares de bovinos portadores de tuberculose. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG - CONPEEX, 3., 2006, Goiânia. **Anais eletrônicos do III Seminário da Pós-Graduação da UFG** [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2006. n.p.

Experimentos futuros deverão ser realizados para definir o status de ativação dos macrófagos provenientes de PBMC de animais naturalmente infectados pelo *M. bovis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. **Am. J. Physiol.** v.271, p.1424-1437, 1996.
2. CARPENTER, E.; FRAY, L.; GORMLEY, E. Antigen-specific lymphocytes enhance nitric oxide production in *Mycobacterium bovis* BCG-infected bovine macrophages. **Immunology and Cell Biology.** Volume 76 n.4, Page 363, 1998.
3. DENIS, M. Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. **Cell Immunol.** v.132, p.150-157, 1991.
4. DENIS, M.; WEDLOCK, D.N.; BUDDLE, B.M. IFN- γ enhances bovine macrophage responsiveness to *Mycobacterium bovis*: Impact on bacterial replication, cytokine release and macrophage apoptosis. **Immunology and Cell Biology.** v.83, n.6, p.643-648, 2005.
5. HIBBS, Jr. J.B. Nitric a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem Biophys. Res. Commun.** v.157, p.87-94, 1988.
6. VESOSOSKY et al. (2004). VESOSKIY, B.; TURNER, O.C.; TURNER, J.; ORME, I.M. Gamma interferon production by bovine $\gamma\delta$ T cells following stimulation with mycobacterial mycolylarabinogalactan peptidoglycan. **Infect and Immunity**, v.72, p.4612-4618, 2004.
7. WATERS, W.R.; PALMER, M.V.; SACCO, R.E.; WHIPPLE, D.L. Nitric oxide production as an indication of *Mycobacterium bovis* infection in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Journal of Wildlife Diseases.** v.38, n.2, p.338-343, 2003.

-
- 1- Doutoranda em Ciência Animal, Área de concentração em Patologia, Clínica e Cirurgia pela EV/UFG. E-mail: edianevet@yahoo.com.br
 - 2- Mestrando em Medicina Tropical, Área de concentração: Imunologia pelo IPTSP/UFG.
 - 3- Mestrandos em Ciência Animal, Área de concentração em Patologia, Clínica e Cirurgia pela EV/UFG
 - 4- Biomédico autônomo-Estagiário do Laboratório de Imunopatologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública-Imunologia da UFG.
 - 5- Orientadora-Profa. Dra. do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública-Imunologia da UFG.