

ATIVIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DA rIL-17A EM BOVINOS

VITÓRIA SEQUEIRA GONÇALVES¹; FRANCISCO DENIS SOUZA SANTOS²;
RENAN EUGÊNIO ARAUJO PIRAINÉ³; CAROLINA LITCHINA BRASIL⁴; NEIDA
CONRAD⁵; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁶

¹UFPel – vitoriasgon@gmail.com

²UFPel – denis.santos195@gmail.com

³UFPel – renanbiotec@gmail.com

⁴UFPel – carolina.litchinabrasil@hotmail.com

⁵UFPel – conradneida@gmail.com

⁶UFPel – fleivasleite@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A IL-17A foi descoberta em 1993 e sua principal função é tida como o recrutamento de células polimorfonucleares, agindo na indução da inflamação e defesa do hospedeiro, no entanto a produção patológica leva a inflamação excessiva e provoca danos aos tecidos (Song & Qian, 2013).

Ela tem capacidade de induzir a expressão de citocinas importantes a partir de fibroblastos, macrófagos, condrocitos e osteócitos (Veldhoen, 2017). A IL-17 também pode aumentar a expressão das quimiocinas CXCL9 e CXCL10 (Kolls et al., 2008). Também nos sítios de barreiras epiteliais, a IL-17 induz proteínas antimicrobianas (AMPs), que são capazes de inibir diretamente, ou mesmo eliminar os microrganismos invasores (Liévin-Le & Servin, 2006).

Evidências abundantes sugerem que simultaneamente a IL-17 desempenha um papel crucial no aprimoramento da resposta imune antiviral com respostas eficazes, e também pode promover e exacerbar doenças induzidas por vírus (Ma W-T et al., 2019). Sabe-se que uma maior concentração de IL-17 está associada ao aumento da proliferação de células T e por consequência, respostas específicas a um vírus em diferentes espécies (Méndez-Lagares et al, 2017).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade biológica da IL-17 recombinante *in vitro* e realizar testes preliminares *in vivo* para sua utilização como adjuvante vacinal.

2. METODOLOGIA

Para as análises *in vitro* foi realizado cultivo de esplenócitos provenientes de baço bovino cedido por frigorífico, segundo protocolo de Dummer et al., (2014). Fragmentos do baço foram macerados com auxílio de *cell strainer* e após etapas de lavagem foram eluídas em meio RPMI com 10% de SFB (soro fetal bovino) e plantadas em placas de 24 poços na concentração de 10^6 por cavidade. As células foram estimuladas a partir de 20 horas de cultivo com 10 µg de rIL-17A, 5 µg de concanavalina A e somente troca do meio. Após 20 horas de estímulo as células foram coletadas e armazenadas em Trizol® e, posteriormente, o mRNA celular extraído segundo protocolo do fabricante. O mRNA foi molde para síntese de cDNA utilizando *KitHigh Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystems*). A análise de indução de expressão de mRNA de citocinas perante o estímulo de rIL-17^a foram quantificadas pela máquina de qPCR Mx30005P QPCR System (*Agilent Technologies*). Foram utilizados os *primers* descritos na tabela 1.

Tabela 1: Sequência e temperatura de *melting* dos primers utilizados na reação de qPCR para células de origem bovina.

Primer	Tm °C	Sequência (5' - 3')
B- actina Forward	66.4	TGTCCACCTTCCAGCAAGTG
B- actina Reverse	65.1	CTAGAACGATTGCGGTGGA
IL-17 Forward	67.1	CACAGCATGTGAGGGTCAAAC
IL-17 Reverse	65.0	GGTGGAGCGCTTGTGATAAT
IL-4 Forward	67.2	GCCACACGTGCTGAACAAA
IL-4 Reverse	66.5	TCTTGCTTGCCAAGCTGTTG
IL-2 Forward	68.1	CCTCGAGTCCTGCCACAATG
IL-2 Reverse	64.0	CCGTAGAGCTGAAGTAGGTGC

Os valores de Ct obtidos pelo qPCR foram analisados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ segundo descrito por Livak & Schmittgen, (2001).

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais de 3 animais: 1. *rIL-17+gD* e 2.*gD* (controle). O grupo *rIL-17+gD* recebeu duas doses de 3 mL contendo 100 µg de *rIL-17* e 100 µg de *gD* adsorvidos em 10% de hidróxido de alumínio. Já o grupo controle recebeu duas doses de 3 mL contendo 100 µg de *gD* e 10% de hidróxido de alumínio. As duas doses foram administradas com intervalo de 21 dias. Foram coletadas amostras de sangue a cada 7 dias até o dia 35 do experimento (nº CEEA 8323).

A presença de anticorpos neutralizantes contra BoHV-5 foi avaliada através da técnica de soroneutralização (FISCHER et al., 2007). Os títulos de anticorpos foram calculados pelo método de Behresn e Karben para determinação da diluição máxima capaz de neutralizar 100 CCID50% do vírus. Para avaliar os níveis de IgG total, foi utilizada a técnica de ELISA indireto (DUMMER et al., 2014b). A leitura foi realizada no leitor de microplacas a 492 nm. O valor da absorbância de cada amostra de soro foi dividido pelo valor de absorbância do dia 0. O resultado foi expresso em nível de soroconversão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A realização do qPCR para a determinação dos níveis de transcrição das citocinas foi realizado com temperaturas de desnaturação a 95 °C, anelamento a 60 °C e extensão a 72 °C, e geraram os resultados demonstrados na figura 1.

A IL-17, juntamente com outras citocinas, possui a capacidade de regular a própria expressão, desenvolvendo um *feedback* positivo, que aumenta sua produção e fortalece os efeitos provocados no sistema imune, como o aumento das respostas de fase aguda (Ogura et al., 2008). Além disso, gerou o *feedback* positivo sobre a transcrição do próprio mRNA de IL-17, induzindo que as células expressassem ainda mais IL-17 em resposta a este estímulo. Neste trabalho as células estimuladas com *rIL-17A* promoveram uma transcrição de mRNA de IL-4. Embora a IL-4 seja uma citocina tipo Th2, o aumento da expressão pode ser justificado pela necessidade de um controle de danos por parte Th2, caso houvesse um estímulo excessivo de IL-17, promovendo danos ao tecido devido ao alto recrutamento de neutrófilos. A interação entre IL-17/neutrófilos e a resposta Th2 é diferente de acordo com tempo e os tipos de células envolvidas (Kinyanjui et al., 2015). Esse feedback entre IL-17 e IL-4 é de importância inestimável em situações em que IL-17 agrava a patologia (Allen et al., 2015). Sabe-se que o impacto da IL-2 na indução de linfócitos Th17 pode variar significativamente dependendo do subconjunto de linfócitos T CD4+ (Deknuydt et al., 2009). Os resultados apresentados neste trabalho, sustentam a ideia de que a

IL-2 também funciona como reguladora da resposta imune. Diante de um estímulo da rIL-17A os esplenócitos induziram uma resposta de expressão de IL-2. Essa expressão pode ter ocorrido com a intenção de controlar uma resposta exacerbada de IL-17, direcionando a diferenciação de linfócito T DC4+ para Treg, e não Th17.

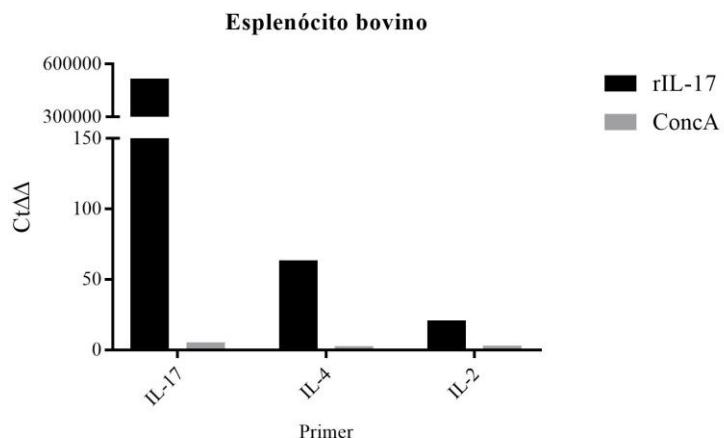


Figura 1: Níveis de transcrição relativa de mRNA das interleucinas 17, 4 e 2, por esplenócitos bovinos estimulados com rIL-17 e ConcA.

O grupo que recebeu a rIL-17 na composição da vacina apresentou soroconversão aproximadamente duas vezes maior do que o grupo controle (Figura 2A). A utilização da rIL-17 como adjuvante imunológico na vacina estimulou a produção de anticorpos neutralizantes contra BOHV-5 quando comparado com o grupo controle (Figura 2B).

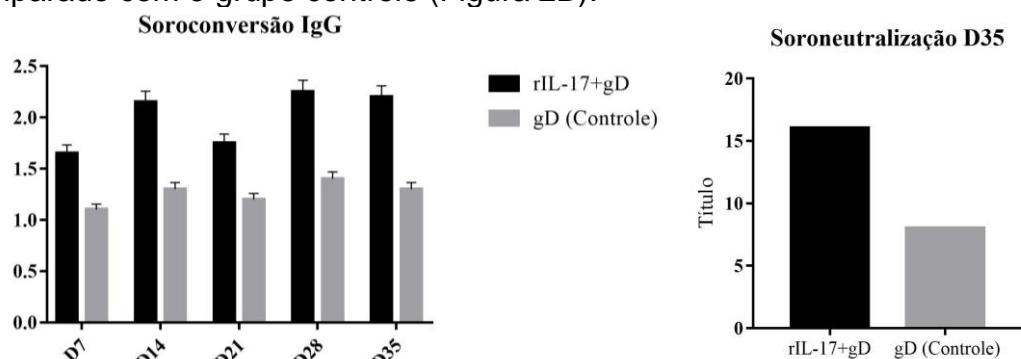


Figura 2: A) Níveis de soroconversão de IgG total nas coletas dos dias 7, 14, 21, 28 e 35, dos grupos rIL-17+gD e controle; B) Títulos de anticorpos neutralizantes do dia 35 do grupo rIL-17+gD e controle.

Nossos resultados estão de acordo com a literatura que indica que a IL-17 está envolvida na manutenção e recrutamento de células B, sendo essas envolvidas na função protetora do hospedeiro durante uma infecção viral (produção de anticorpos) (Ma W-T; et al, 2019).

4. CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que a utilização da rIL-17 como adjuvante vacinal para doenças víricas, pode ser uma alternativa no incremento da proteção a essas doenças.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DEKNUYDT, F., BIOLEY, G., VALMORI, D. & AYYOUB, M. (2009). IL-1 β and IL-2 convert human Treg into TH17 cells. *Clinical Immunology*. 131(2). p. 298–307. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2008.12.008>.

DUMMER, L.A., ARAUJO, I.L., FINGER, P.F., DOS SANTOS, A.G., DA ROSA, M.C., CONCEIÇÃO, F.R., FISCHER, G., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. & LEITE, F.P.L. (2014). Immune responses of mice against recombinant bovine herpesvirus 5 glycoprotein D. *Vaccine*. 32(21). p. 2413–2419.

Kenneth J. Livak and Thomas D. Schmittgen 2001 . Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 2^{DDCT} Method *METHODS* 25, 402–408 (2001) doi:10.1006/meth.2001.1262, available online at <http://www.idealibrary.com>

KINYANJUI, M.W., SHAN, J., NAKADA, E.M., QURESHI, S.T., FIXMAN, E.D., (2015). Dose-Dependent Effects of IL-17 on IL-13 – Induced Airway Inflammatory Responses and Airway Hyperresponsiveness. *Journal of immunology*. 190. p. 3859–3868.

KOLLS, J.K., JR, P.B.M. & CHAN, Y.R. (2008). Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nature immunology*. 11. p. 829–835.

Ma W-T, Yao X-T, Peng Q, Chen D-K. 2019 The protective and pathogenic roles of IL-17 in viral infections: friend or foe? *Open Biol.* 9: 190109. <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.190109>

Mendez-Lagares G, Lu D, Merriam D, Baker CA, Villinger F, Van Rompay KKA, Mccune JM, Hartigan- O'connor DJ. 2017 IL-21 therapy controls immune activation and maintains antiviral CD8(+) T cell responses in acute simian immunodeficiency virus infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 33, S81–S92. (doi:10.1089/aid.2017.0160)

OGURA, H., MURAKAMI, M., OKUYAMA, Y., TSURUOKA, M., KITABAYASHI, C., KANAMOTO, M., NISHIHARA, M., IWAKURA, Y. & HIRANO, T. (2008). Interleukin-17 Promotes Autoimmunity by Triggering a Positive-Feedback Loop. *Immunity*. 29(4). p. 628–636. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2008.07.018>.

SONG, X. & QIAN, Y. (2013). The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling. *Cytokine*. 62(2). p. 175–182. Available at: 1603 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2013.03.014>.

VELDHOEN, M. (2017). Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. *Nature Immunology*. 18(6). p. 612–621.