

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

GABRIEL ALEXANDRE DE AGUIAR

**AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE VACINA CONTRA *Mycoplasma
hyopneumoniae* UTILIZANDO A SÍLICA NANOESTRUTURADA SBA-15
COMO ADJUVANTE**

JABOTICABAL – SP

2024

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE VACINA CONTRA *Mycoplasma hyopneumoniae* UTILIZANDO A SÍLICA NANOESTRUTURADA SBA-15 COMO ADJUVANTE

Acadêmico: Gabriel Alexandre de Aguiar

Orientador: Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira

Coorientadora: Dra. Daniela Gomes da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Jaboticabal – SP
2º Semestre/2024

D278a

de Aguiar, Gabriel Alexandre

Avaliação da imunogenicidade de vacina contra Mycoplasma Hyopneumoniae utilizando a sílica nanoestruturada SBA-15 como adjuvante/ Gabriel Alexandre de Aguiar. -- Jaboticabal, 2024

57 f. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira

Coorientadora: Dra. Daniela Gomes da Silva

1. Sus scrofa domesticus. 2. Pneumonia enzoótica suína. 3. Proteínas de fase aguda.
4. Imunoglobulinas. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus Jaboticabal



GABRIEL ALEXANDRE DE AGUIAR

AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE VACINA CONTRA *Mycoplasma hyopneumoniae* UTILIZANDO A SÍLICA NANOESTRUTURADA SBA-15 COMO ADJUVANTE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Patologia animal – Enfermidades infecciosas

Orientador: Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira

Coorientador: Dra. Daniela Gomes da Silva

Data da defesa: 19/11/2024

☒ Aprovado
() Reprovado

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira

UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal

Profa. Dra. Marita Vedovelli Cardozo

UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal

Dr. Tiago Henrique Camara De Bem

USP – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Câmpus de Pirassununga

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: 25/11/24 "ad-referendum"

Profa. Dra. Annelise Carla Camplesi
Chefe do Departamento

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Edson de Aguiar e Lúcia Helena Freire de Aguiar, que desde sempre me incentivaram continuar estudando e aprendendo, assim como ter novas experiências desde meus primeiros anos de escola até o atual momento, finalizando a graduação em Ciências Biológicas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira, pela oportunidade e por me receber em 2021 em seu laboratório e por me auxiliar desde então com os projetos, possibilitando novas trocas de experiências que nunca imaginaria ser possível, e com muitas conversas que tivemos e que considero muito importantes até hoje.

A todos os meus colegas do Laboratório de Medicina de suínos, em especial a Dra. Daniela Gomes da Silva, Fernando Petri, e Cláudia Nogueira da Silva, vocês não apenas me acolheram quando entrei para o laboratório, mas com certeza me ensinaram muitas lições importantes, sendo sobre pesquisa ou sobre a vida, além das muitas risadas que demos ao longo de todos esses anos.

Ao meu companheiro, Gabriel de Araujo Pio, por estar ao meu lado nos momentos que eu mesmo não acreditava que conseguiria e por me mostrar que a vida não precisa ser tão séria quanto eu costumava pensar que era.

Aos meus amigos queridos, Ana Paula, Verônica Maria, Vitória Maria, Giovana Gomes, Felipe Ricardo, Talia e Ayra Maria, por todos esses anos que passamos juntos durante a graduação, seja no núcleo comum, ou no eixo de meio ambiente. Durante esses anos rimos, surtamos um pouco em certos momentos, nos ajudamos e chegamos ao final desse ciclo com memórias muito especiais.

À Michele, *in memoriam*, a gatinha do laboratório didático da universidade, que me ajudou emocionalmente em momentos difíceis desses cinco anos de graduação compartilhando todo seu carinho e afeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo nº 2023/04557-1) pela bolsa concedida para a realização de meu segundo projeto de Iniciação Científica que se desenvolveu e se tornou este Trabalho de Conclusão de Curso.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma participaram durante o desenvolvimento deste trabalho ou durante minha graduação.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	v
1. Introdução.....	5
2. Objetivos	6
2.1. Objetivos gerais.....	6
2.2. Objetivos específicos.....	6
3. Revisão de literatura	7
3.1. <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	7
3.2. Vacinas e adjuvantes.....	9
3.3. Proteínas de fase aguda	10
4. Material e Métodos	12
4.1. Preparo da vacina inativada injetável específica para <i>M. hyopneumoniae</i>	12
4.1.1 Cultivo da bactéria e preparo do composto vacinal	12
4.1.2 Produção e caracterização da vacina específica.....	13
4.1.3. Administração da vacina inativada injetável e inoculação dos suínos	16
4.2. Seleção dos animais e delineamento experimental	16
4.3. Exame físico.....	18
4.4. Colheita das amostras de sangue	19
4.5. Análises laboratoriais.....	19
4.5.1. Proteinograma sérico	19
4.6. Análise estatística.....	21
5. Resultados	21
5.1. Exame físico.....	21
5.2. Proteinograma sérico	27
6. Discussão	44
7. Conclusão	46
8. Referências	47

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **"Avaliação da imunogenicidade de vacina contra *Mycoplasma hyopneumoniae* utilizando a sílica nanoestruturada SBA-15 como adjuvante"**, protocolo nº: 003841/23, sob a responsabilidade do Prof. Dr. LUÍS GUILHERME DE OLIVEIRA, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP.

Vigência do Projeto	01/06/2023 a 01/06/2024
Espécie / Linhagem	Sus scrofa domesticus/ Linhagem comercial (Landrace x Large White)
Nº de animais	36
Peso / Idade	5 - 6 kg – 21 dias até 40 kg (75 dias)
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Granja comercial

Jaboticabal, 16 de maio de 2023.

Profa. Dra. Paola Castro Moraes
Vice-coordenadora em exercício – CEUA FCAV

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209-7100 - www.fca.vunesp.br

AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE VACINA CONTRA *Mycoplasma hyopneumoniae* UTILIZANDO A SÍLICA NANOESTRUTURADA SBA-15 COMO ADJUVANTE

RESUMO

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente etiológico da Pneumonia Enzoótica Suína (PES) que provoca alterações no epitélio respiratório e nas estruturas ciliares das vias aéreas causando grandes prejuízos econômicos devido à sua alta prevalência e perda contínua de desempenho dos animais. Vacinas comerciais, embora efetivas na redução dos sinais clínicos dos animais, não impedem a infecção pela bactéria, mostrando a necessidade de novas tecnologias para o desenvolvimento de imunizantes. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a imunogenicidade de uma nova vacina inativada contra *M. hyopneumoniae*, desenvolvida com a sílica mesoporada SBA-15 como adjuvante. Para isso, foram avaliados 36 leitões desmamados (20 dias de idade) que foram alocados em três grupos experimentais, sendo: G1 (n=12): leitões imunizados com vacina comercial de dose única aos 24 dias de idade; G2 (n=12): leitões imunizados com a vacina preparada (SBA-15) aos 24 dias de idade; e G3 (n=12): leitões que receberam apenas a sílica SBA-15 sem incorporação do antígeno, todos pela via intramuscular. Imediatamente antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a imunização e antes do desafio experimental com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D21) e 14 dias após o desafio (D35) foram realizadas a aferição da temperatura retal e a pesagem dos animais. Nesses mesmos momentos foram colhidas amostras de sangue venoso para a análise da concentração de imunoglobulinas (IgG e IgA) e proteínas de fase aguda (PFAs), pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). A avaliação das alterações respiratórias, por meio do escore de tosse dos animais (em repouso e em exercício), foi realizada após a infecção experimental. Os leitões imunizados com vacina intramuscular contra *M. hyopneumoniae* preparada com a sílica SBA-15 apresentaram boa resposta imune humoral (IgA) e de PFAs (ceruloplasmina, α 1-antitripsina, haptoglobina e α 1-glicoproteína ácida), e menores escores de alterações respiratórias após o desafio experimental, em comparação com a

vacina comercial, e não apresentaram reações adversas locais ou sistêmicas após a administração do imunizante.

Palavras-chave: *Sus scrofa domesticus*, pneumonia enzoótica suína, proteínas de fase aguda, imunoglobulinas.

EVALUATION OF THE IMMUNOGENICITY OF A VACCINE AGAINST *Mycoplasma hyopneumoniae* USING NANOSTRUCTURED SILICA SBA-15 AS AN ADJUVANT

ABSTRACT

Mycoplasma hyopneumoniae is the etiological agent of Porcine Enzootic Pneumonia (PEP) causing changes in the respiratory epithelium and ciliary structures of the airways, leading to great economic losses due to its high prevalence and continuous loss of animal performance. Commercial vaccines, although effective in reducing clinical signs in animals, do not prevent the infection by the bacteria, showing the need for new technologies for the development of immunizing agents. Thus, the objective of the present study was to evaluate the immunogenicity of a new inactivated vaccine against *M. hyopneumoniae*, developed with mesoporous silica SBA-15 as an adjuvant. For this purpose, 36 weaned piglets (20 days of age) were evaluated and allocated into three experimental groups, as follows: G1 (n=12): piglets immunized with a single dose of a commercial vaccine at 24 days of age; G2 (n=12): piglets immunized with the prepared vaccine (SBA-15) at 24 days of age; and G3 (n=12): piglets that received only SBA-15 silica without antigen incorporation, all by the intramuscular route. Immediately before immunization (D0), 24 hours after immunization (D1), 21 days after immunization and before the experimental challenge with 10^6 CCU/mL of *M. hyopneumoniae* (D21) and 14 days after the challenge (D35), rectal temperature was measured and the animals were weighed. At the same time points, venous blood samples were collected for analysis of the concentration of immunoglobulins (IgG and IgA) and acute phase proteins (APPs) by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The evaluation of respiratory changes, using the animals' cough score (at rest and during exercise), was performed after the experimental infection. Piglets immunized with the intramuscular vaccine against *M. hyopneumoniae* prepared with SBA-15 silica showed good humoral (IgA) and PFA (ceruloplasmin, α 1-antitrypsin, haptoglobin and α 1-acid glycoprotein) immune response, and lower respiratory disease scores after the experimental challenge, when compared with the commercial vaccine,

and did not present local or systemic adverse reactions after the administration of the immunizing agent.

Keywords: *Sus scrofa domesticus*, porcine enzootic pneumonia, acute phase proteins, immunoglobulins.

1. Introdução

A produção de suínos se destaca como uma das principais fontes de proteína animal, devido à eficiente conversão alimentar e crescimento rápido dos animais, chegando a 5.156 milhões de toneladas de carne suína produzida em 2023 apenas no Brasil (Demattê Filho, Pereira e Pereira, 2019; ABPA, 2024).

A partir da década de 1960, em razão das grandes mudanças na produção de suínos relacionadas à criação intensiva em granjas, maior taxa de lotação e adoção de programas de melhoramento genético, alguns problemas sanitários acabaram se instalando nos plantéis (Alarcón, Allepuz e Mateu, 2021). Dentre eles, as enfermidades respiratórias representam um dos principais desafios da suinocultura mundial devido à sua etiologia complexa e interação entre agentes (bacterianos e/ou virais), hospedeiro e ambiente (Thakor *et al.*, 2023).

Dentre os principais patógenos causadores das enfermidades respiratórias dos suínos, se destaca o gênero *Mycoplasma*, em especial *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*), que é o agente etiológico da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), uma doença respiratória de caráter crônico, sendo um dos agentes primários do Complexo de Doenças Respiratórias dos Suínos (CDRS) (Pieters e Maes, 2019).

Após adentrar no organismo do hospedeiro, a bactéria se adere ao epitélio respiratório da traqueia, brônquios e bronquíolos, causando a destruição dos cílios, por meio da liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e por meio da interação com proteínas de membrana, comprometendo o aparato mucociliar. Juntamente com a destruição ciliar, *M. hyopneumoniae* também causa uma reação inflamatória exacerbada, liberando diversas interleucinas (IL) como IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, interferon- γ (INF- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), que, associados à hiperplasia linfóide, ocasiona lesões pulmonares característica da doença nos animais (Maes *et al.*, 2017; Almeida, *et al.*, 2020).

Nas granjas produtoras, a vacinação dos suínos é uma das formas de controle da doença, amenizando os sinais clínicos dos animais infectados (Pieters e Maes, 2019). Entretanto, por mais que as vacinas ajudem nesse quesito, elas não impedem a infecção e posterior colonização do epitélio respiratório dos suínos, o que faz com que a taxa de animais infectados ainda se mantenha alta

(Haesebrouck *et al.*, 2004; Takeuti *et al.*, 2017). Como forma de melhorar a eficácia das vacinas, novas pesquisas em relação a adjuvantes são cada vez mais estimuladas, visto que esses componentes podem potencializar a ação das mesmas. Nesse sentido, a sílica nanoestruturada SBA-15 (*Santa Barbara Amorphous-15*) se demonstra promissora, principalmente por melhorar a apresentação antigênica, possuir poucos efeitos adversos e ter baixa toxicidade (Rasmussen *et al.*, 2019).

As proteínas de fase aguda são um grupo de proteínas cujas concentrações plasmáticas aumentam (proteínas de fase aguda positivas) ou diminuem (proteínas de fase aguda negativas) quando a homeostase do organismo é afetada por processos inflamatórios, infecciosos ou traumáticos. Tal característica justifica a análise dessas proteínas como biomarcadores, tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária, para o monitoramento de doenças e detecção de quadros que ainda se encontram na forma subclínica (Petersen, Nielsen e Heegard, 2004).

Tais informações demonstram a importância de novos estudos em busca de vacinas e de componentes que as tornem mais eficazes no controle de doenças, como a utilização da sílica nanoestruturada SBA-15 como adjuvante, e também de novos métodos, como a mensuração de PFAs, que permitam o acompanhamento da evolução da doença e o sucesso do tratamento utilizado.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho foi avaliar a imunogenicidade e o perfil das proteínas de fase aguda (PFAs) de suínos imunizados com uma vacina inativada produzida com a sílica mesoporada SBA-15 frente ao desafio experimental com *M. hyopneumoniae*.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a resposta imune e a resposta de fase aguda em leitões que receberam imunização com a vacina comercial intramuscular frente ao desafio com *M. hyopneumoniae*;

- Avaliar a resposta imune e a resposta de fase aguda em leitões que receberam imunização com a vacina intramuscular desenvolvida por nosso grupo de pesquisa (vacina produzida com sílica mesoporada SBA-15) frente ao desafio com *M. hyopneumoniae*;
- Avaliar a resposta imune e resposta de fase aguda em leitões vacinados que receberam imunização com uma vacina contendo apenas SBA-15, sem incorporação de antígeno, frente ao desafio com *M. hyopneumoniae*;
- Comparar os resultados obtidos com os diferentes protocolos administrados aos animais.

3. Revisão de literatura

3.1. *Mycoplasma hyopneumoniae*

O gênero *Mycoplasma* apresenta características distintas quando comparadas a outros grupos de procariotos por não possuir parede celular, conter colesterol na membrana plasmática e apresentar um genoma pequeno. As bactérias desse gênero geralmente apresentam formas arredondadas que variam de 0,3 a 0,8 μm e com conteúdo celular equivalente a 5% do conteúdo de um bacilo comum, formando colônias igualmente pequenas de até 1 mm de diâmetro, semelhantes a “ovos fritos”. Além disso, devido ao seu tamanho reduzido, apresentam um pequeno número de organelas, estando apenas presentes aquelas que são indispensáveis para seu crescimento e multiplicação (membrana citoplasmática, DNA circular em dupla fita, moléculas de RNA, ribossomos e grânulos citoplasmáticos) (Poveda *et al.*, 2002; Razin, 2006).

M. hyopneumoniae é conhecido por ser uma das menores bactérias, tanto em tamanho (0,2 a 0,4 μm) quanto em relação à composição genética (580-1380 mil pares de bases - mpb), sendo anaeróbias facultativas, Gram-negativas, imóveis e fastidiosas (Laber *et al.*, 2002; Pieters e Maes, 2019; Maes *et al.*, 2021). A ausência da parede celular, unido ao fato da bactéria se localizar no meio intracelular, faz com que *M. hyopneumoniae* seja resistente ao uso terapêutico de antimicrobianos. No meio externo, a bactéria é capaz de sobreviver por quatro dias, à temperatura ambiente, e até oito dias em locais com presença de poeira e baixas temperaturas, em torno de 4°C (Takeuti e Santos, 2022).

Este microrganismo é o agente etiológico da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), uma doença do trato respiratório, com alta taxa de morbidade e baixa taxa de mortalidade nas granjas produtoras, sendo também uma das principais bactérias do Complexo das Doenças Respiratórias dos Suínos (CDRS) (Storino *et al.*, 2023).

A transmissão da PES nas granjas produtoras ocorre de forma direta, principalmente pelo contato naso-nasal de animais infectados com animais suscetíveis e livres da doença, e também por meio da interação de matrizes com suas leitegadas durante a lactação, mais frequentemente em fêmeas primíparas e nas interações nos primeiros dias de vida. Além disso, estudos recentes mostram que a transmissão indireta via aerossol pode ter um papel importante na dispersão do patógeno, podendo acometer plantéis que se encontram a 3,2 Km de distância de locais positivos para *M. hyopneumoniae* (Morris *et al.*, 1995; Maes, Sibila e Pieters, 2020; Betlach *et al.*, 2021). Ademais, tanto nos casos de infecções naturais quanto em condições experimentais, a excreção de *M. hyopneumoniae* pode ocorrer por mais de 200 dias, mostrando que a infecção pode continuar se disseminando nos plantéis por longos períodos (Takeuti *et al.*, 2017; Brandalise *et al.*, 2023).

Após adentrar o trato respiratório dos animais, a bactéria se liga aos cílios do epitélio respiratório, estrutura responsável por auxiliar o organismo do animal a excretar partículas estranhas presentes no trato respiratório, promovendo ciliostase e destruição dessas estruturas (Thacker, 2006). Diferentemente de outros grupos de bactérias patogênicas, o gênero *Mycoplasma* não libera toxinas nos tecidos. Muitas espécies, incluindo *M. hyopneumoniae*, utilizam o glicerol presente no organismo do hospedeiro como fonte de carbono para metabolizarem e liberarem peróxido de hidrogênio (H₂O₂), sendo este o composto responsável por causar as lesões características da doença (Maes *et al.*, 2017).

Devido à destruição dos cílios do trato respiratório, os animais se tornam mais suscetíveis a infecções secundárias por outros agentes patogênicos, como bactérias e vírus. Dentre eles, pode-se destacar as bactérias *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), *Pasteurella multocida* (*P. multocida*), *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis* e *Bordetella bronchiseptica*, e os vírus como o da Síndrome Respiratória e Reprodutiva dos Suínos (PRRS), circovírus suíno tipo 1

e 2 (PCV1 e PCV2) e o vírus da influenza suína (VIS). Ademais, a interação desses agentes bacterianos e/ou virais com *M. hyopneumoniae* causa prejuízos econômicos ainda mais acentuados nas granjas produtoras (Cheong *et al.*, 2017; Rech *et al.*, 2017; Thakor *et al.*, 2023).

O aumento das taxas de infecção por *M. hyopneumoniae* nos plantéis é uma grande preocupação para a suinocultura, uma vez que os animais apresentam perda contínua de desempenho. Estudos indicam uma perda de aproximadamente 1,8 g de peso para cada 1% de área pulmonar afetada pelo patógeno, ocorrência de infecções concomitantes com outros patógenos e óbitos, levando a grandes perdas econômicas, além dos gastos com a aquisição de insumos, como medicamentos e vacinas para o controle da enfermidade (Thacker e Minion, 2010; Ferraz *et al.*, 2020; Clavijo *et al.*, 2021).

3.2. Vacinas e adjuvantes

Dentre as principais medidas para o controle de *M. hyopneumoniae* nas granjas suínícolas está a administração de vacinas. No Brasil, são comercializadas apenas vacinas contra *M. hyopneumoniae* produzidas com a bactéria inativada, enquanto em países como China e México, já há a regulamentação e comercialização de vacinas atenuadas. Para a produção dessas vacinas, frequentemente são utilizadas células bacterianas pertencentes à cepa J de *M. hyopneumoniae* devido à maior facilidade de cultivo dessa cepa em ambiente laboratorial quando comparada com outras cepas do patógeno. Além disso, as vacinas podem ser produzidas apenas contra um agente (vacinas univalentes), dois patógenos (vacinas bivalentes) ou contra diversos agentes patogênicos (vacinas polivalentes) (Maes, Sibila e Pieters, 2020).

Para a produção das vacinas atenuadas utiliza-se o microrganismo vivo, que recebe um tratamento no meio de cultivo para que ele perca a capacidade de provocar a doença. A maior vantagem conferida por esse tipo de vacina é a estimulação de toda resposta imunológica inata e adaptativa, induzindo uma resposta imune mais completa. Em contrapartida, as vacinas inativadas são produzidas a partir do microrganismo morto, obtido após um tratamento térmico, e, apesar da imunidade conferida por esse tipo de vacina ser inferior à das vacinas atenuadas (Haesebrouck *et al.*, 2004; Tao *et al.*, 2019), a maior vantagem

está na sua segurança devido à ausência de ocorrência de reversão vacinal (Abbas, Lichtman e Pillai, 2015).

Como um meio de potencializar os efeitos e a duração da resposta imune no organismo, muitos laboratórios adicionam adjuvantes em suas formulações vacinais (Wilson-Welder *et al.*, 2009; Pulendran, Arunachalam e O'Hagan, 2021). Entretanto, antes da seleção de um potencial adjuvante para a composição de vacinas, é importante que sejam considerados aspectos de sua estrutura e ação, assim como nível de toxicidade, interação com o antígeno, qualidade e possíveis efeitos colaterais (Mota, Lima e Melo, 2006).

O adjuvante comumente utilizado nas vacinas nacionais contra *M. hyopneumoniae*, e também nas vacinas contra PCV-2 e contra o vírus da influenza suína do tipo A, é o hidróxido de alumínio (Chia *et al.*, 2015; Charemtantanakul, 2020).

Devido aos resultados promissores do uso em vacinas humanas, a utilização da sílica como adjuvante em vacinas de uso veterinário vem ganhando atenção por seus benefícios. Dentre esses adjuvantes, a sílica nanoestruturada SBA-15 se destaca por ser um bom veículo de apresentação de antígeno para o sistema imune, criando assim uma boa resposta inflamatória, além de não apresentar efeitos adversos, como toxicidade (Oliveira *et al.*, 2022), podendo ser administrada por diferentes vias, como a intraperitoneal e oral (Virginio *et al.*, 2017; Storino *et al.*, 2023), além de reduzir as áreas de consolidação pulmonar em animais vacinados e infectados com *M. hyopneumoniae* (Mechler-Dreibi *et al.*, 2021).

3.3. Proteínas de fase aguda

Quando o organismo se encontra em uma posição em que sua homeostase é comprometida, múltiplas respostas imunes são estimuladas, a fim de auxiliar o organismo a voltar ao seu estado original e saudável. Esta primeira reação é chamada de resposta de fase aguda (RFA) que pode ser local ou sistêmica, buscando eliminar a causa do problema (Gruys *et al.*, 2005). Essa resposta geralmente é muito rápida e possui um caráter inespecífico, agindo sobre diferentes microrganismos possivelmente patogênicos. As ações desta resposta são carregadas por proteínas específicas presentes no sangue, as proteínas de

fase aguda (PFAs), que têm suas concentrações aumentadas ou reduzidas em decorrência de uma infecção mesmo antes do animal apresentar os sinais clínicos indicadores de doença (Contin *et al.*, 2015).

As PFAs são produzidas inicialmente nos hepatócitos e as suas concentrações se estabilizam depois de alguns dias ou semanas, contudo, as concentrações das PFAs podem permanecer alteradas caso o indivíduo apresente uma infecção persistente. A produção das PFAs também é estimulada pela presença de citocinas, como interleucinas (IL), fatores de necrose tumoral (TNF) e interferons (IFN) (Khalil e Al-Humadi, 2019). Ademais, a magnitude da infecção é outro fator importante quando se analisa a concentração destas proteínas. Uma infecção forte leva a uma resposta imunológica igualmente forte, o que indica uma maior alteração nas concentrações das PFAs (Reagan *et al.*, 2020), onde as proteínas cujas concentrações apresentam um aumento são chamadas de proteínas de fase aguda positivas, como ceruloplasmina, α 1-antitripsina, haptoglobina, α 1-glicoproteína ácida, proteína C-reativa, amiloide A sérica, fibrinogênio e componentes do complemento, enquanto que as proteínas que têm suas concentrações reduzidas são chamadas de proteínas de fase aguda negativas e incluem albumina e transferrina (Kaneko, Harvey e Bruss, 2008; Eckersall e Bell, 2010; Alves *et al.*, 2020).

Muito utilizado na medicina humana, o monitoramento das PFAs vem ganhando espaço na medicina veterinária; por meio delas, é possível identificar indivíduos saudáveis, acompanhar a evolução do quadro clínico e respostas aos tratamentos (Parra *et al.*, 2006). Por meio do monitoramento contínuo das PFAs também é possível a detecção de infecções que se encontram na forma subclínica, visto que algumas proteínas já podem apresentar alterações horas após a infecção se instalar. Da mesma forma, por servirem como biomarcadores, a análise das PFAs também pode auxiliar na escolha de protocolos vacinais mais eficazes para que sejam implantados em granjas comerciais, visto que é possível avaliar a magnitude da resposta de fase aguda carregada pelas diferentes vacinas testadas, tornando possível a escolha de um protocolo que traga mais benefícios à saúde dos animais (Alves *et al.*, 2020; Powanda e Moyer, 2021).

Fatores relacionados ao estado fisiológico do animal (idade, gestação, lactação) e fatores externos (alimentação, alojamento, transporte) também podem

influenciar a intensidade da resposta das PFAs (Gómez-Laguna *et al.*, 2011; Heegaard *et al.*, 2011; Miller e Gianazza, 2023).

Estudos sobre a resposta das PFAs tanto em suínos infectados apenas por *M. hyopneumoniae* quanto em suínos com infecções secundárias concomitantes (CDRS) mostraram o aumento das concentrações séricas das PFAs e maiores teores séricos dessas proteínas quanto maiores as áreas de consolidação pulmonar nos animais infectados. Adicionalmente, quando avaliada a relação entre a vacinação dos suínos e o nível proteção contra os agentes, houve uma correlação positiva entre as concentrações séricas das PFAs e os títulos séricos de anticorpos vacinais (Perez, 2019; Saco e Bassols, 2023). Isso mostra a importância do estudo da resposta das PFAs e como elas podem ser utilizadas para monitorar a saúde dos animais e avaliar a eficácia das vacinas produzidas contra os diferentes patógenos.

4. Material e Métodos

4.1. Preparo da vacina inativada injetável específica para *M. hyopneumoniae*

4.1.1 Cultivo da bactéria e preparo do composto vacinal

A vacina foi preparada utilizando um inóculo de *M. hyopneumoniae* (cepa 232) na concentração de 10^8 CCU/mL, adquirido em parceria com a Iowa State University – Ames, IA, USA. Uma alíquota do inóculo foi transferida para três frascos estéreis contendo 5 mL de meio de cultivo Friis e mantidos em estufa agitadora a 37°C para que ocorresse o crescimento e multiplicação das bactérias visando obter um volume final de 15 mL. A partir dos 15 mL de cultura foram preparados quatro frascos contendo 200 mL de meio Friis cada, aos quais foram adicionados 2 mL da cultura inicial após primeira passagem e mantidos sob as mesmas condições de incubação, sendo avaliada diariamente a mudança na coloração do meio de cultivo. Uma amostra do inóculo foi submetida ao cultivo microbiológico em meios ágar-sangue e MacConkey (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) para verificar a ausência de contaminação. A concentração de *M. hyopneumoniae* foi determinada a partir de diluições decimais seriadas das amostras em meio Friis, de 10^{-1} a 10^{-8} , que indica a concentração por meio da mudança de coloração da maior diluição.

O conteúdo do frasco de cultura foi centrifugado em ultracentrífuga a 13.700 x g por 45 minutos em tubos apropriados, previamente autoclavados. As células bacterianas depositadas no fundo dos tubos (*pellets*) foram ressuspensas em 15 mL de PBS 1X para lavagem. Os tubos então foram centrifugados novamente a 21.000 x g, e este procedimento foi repetido duas vezes até a obtenção de um *pellet* limpo. Cada *pellet* foi finalmente ressuspenso em 10 mL de 1X PBS e armazenado em tubos Falcon® estéreis. Posteriormente, este conteúdo foi sonificado três vezes consecutivas em sonificador (SONI-Tech Ultrasonic Cleaning, Scientek, Orlando, FL, USA) na frequência de 20 Hz durante um minuto, com intervalos de um minuto entre os processos. Uma alíquota do conteúdo dos frascos foi retirada para confirmar a presença de *M. hyopneumoniae* por qPCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores e sondas específicas para a bactéria, a fim de se obter resultado positivo. Para determinar a concentração de proteína no lisado celular, foi utilizado o método de Bradford (ThermoFisher®, Wilming, USA) seguido da medição em Spectrophotometer NanoDrop™ One (ThermoFisher®, Wilming, USA), a fim de se obter a quantidade e concentração adequada para a utilização de 500 µg de extrato proteico de *M. hyopneumoniae* na dose da vacina produzida para cada leitão (Processo FAPESP n° 19/19710-4).

4.1.2 Produção e caracterização da vacina específica

A produção da vacina foi realizada em parceria com o Departamento de Física Aplicada, do Instituto de Física, da Universidade de São Paulo (USP-SP), Instituto Butantan e Laboratório de Materiais Híbridos (Unifesp-Diadema), que têm desenvolvido pesquisas com vacinas para humanos utilizando como adjuvante a sílica nanoestruturada SBA-15 (Processo FAPESP n° 17/17844-8), o qual também mostrou resultados promissores em suínos, especificamente contra a Pneumonia Enzoótica dos Suínos (PES) em estudos conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa (Processo FAPESP n° 18/12742-5; 20/04707-5; 20/05198-7; 20/08028-5).

O extrato proteico sonificado de *M. hyopneumoniae* foi incorporado lentamente à sílica SBA-15, seguindo protocolo padronizado por nosso grupo de pesquisa em trabalhos anteriores envolvendo a produção de vacinas que

utilizaram esta nanotecnologia (Processo FAPESP nº18/12742-5; 20/05198-7). Brevemente, a proporção utilizada antígeno:SBA-15 foi de 1:35 (para cada 1 mg de extrato proteico de *M. hyopneumoniae*, foram utilizados 35 mg de SBA-15). Inicialmente, a sílica SBA-15 foi pesada em uma balança de precisão, seguida de maceração por bastão de vidro. A sílica macerada foi então submetida ao processo de ativação que consistiu na eliminação da água presente na sílica submetendo-a a aquecimento em estufa a 180°C por 2 horas. Após isto, a sílica macerada e aquecida foi colocada diretamente no dessecador e mantida sob pressão por 1 hora. Ainda, foi adicionada a solução contendo o antígeno de *M. hyopneumoniae* e mantida em estufa a 35°C por 5 dias para que ocorresse a incorporação das proteínas aos nanoporos da sílica e a secagem do complexo formado (SBA-15+antígeno). Após este período em estufa, o produto foi novamente macerado por bastão de vidro. Por fim, a vacina injetável foi formulada em processo semelhante ao descrito por Carvalho *et al.* (2010), que realizou em seu estudo a incorporação de albumina sérica bovina à sílica SBA-15 com o antígeno aderido aos mesoporos e mantida durante 24 horas à temperatura entre 2-8°C para homogeneização completa, até o momento da aplicação nos animais. De forma sucinta, a vacina foi preparada a partir da extração proteica de um cultivo de *M. hyopneumoniae* (cepa 232) e incorporada aos poros da sílica SBA-15 (1:35 mg), e adicionada a uma solução de PBS (pH 7,4) para aplicação intramuscular, resultando em uma dose de 0,5 mg de antígeno em um volume de aproximadamente 2 mL de vacina por leitão (Figura 1). Ainda, a preparação esteve sujeita a pequenos ajustes para promover melhor performance dos resultados.

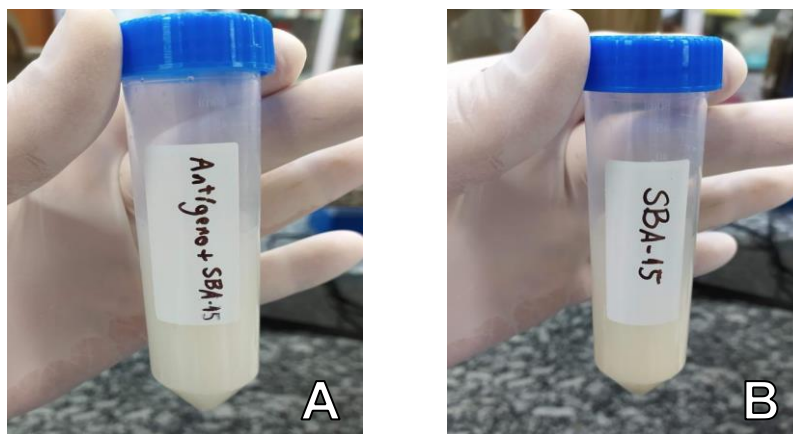


Figura 1. Vacina preparada com antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae* incorporado à sílica SBA-15 (A); Injetável preparado apenas com sílica SBA-15, sem incorporação de antígeno (B).

A avaliação do conjunto sílica-proteínas de *M. hyopneumoniae*, incorporação dos antígenos e análise da vacina produzida foi realizada no Laboratório de Cristalografia do Departamento de Física Aplicada da Universidade de São Paulo (USP), sob supervisão da Profa. Dra. Márcia C. A. Fantini e do Laboratório de Materiais Híbridos da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), sob a supervisão da Profa. Dra. Tereza da Silva Martins. Previamente à incorporação das proteínas à sílica, uma fração do conteúdo proteico foi submetida à caracterização do ponto de vista morfológico e biofísico pelas seguintes análises: espalhamento de raios-X a baixo ângulo (Small Angle X-ray Scattering, SAXS), análise térmica (Thermogravimetry, TG) e calorimetria exploratória diferencial (Differential Scanning Calorimetry, DSC) e microscopia eletrônica de varredura (SEM). Após a produção do complexo (SBA-15+antígeno), uma fração do composto foi submetida à análise de isoterma de absorção de nitrogênio (Nitrogen Adsorption Isotherm, NAI) para avaliar a inclusão dos antígenos à partícula nanoestruturada. A dimensão dos antígenos obtidos a partir da lise das bactérias foi avaliada pelo SAXS e por espalhamento dinâmico de luz (Dynamic Light Scattering, DLS).

Considerando que a sílica SBA-15 utilizada tem como característica a presença de poros de tamanhos variados, o encapsulamento dos antígenos pode ocorrer nos mesoporos (~10 nm) ou nos macroporos com tamanho superior a 50 nm. A liberação do antígeno pode ser avaliada por SAXS em meio ácido e básico

para obter maiores informações que predizeram seu comportamento no organismo dos indivíduos hospedeiros demonstrando sua eficácia

4.1.3. Administração da vacina inativada injetável e inoculação dos suínos

A formulação preparada para protocolo parenteral foi administrada por via intramuscular, com volume total de 2 mL/animal, na região por detrás da orelha próximo ao pescoço (Figura 2). A imunização dos animais foi conferida pela aplicação de uma dose, de acordo com o protocolo definido por grupo experimental do estudo, aos 24 dias de idade (D0). Aos 45 dias de vida (D21), os animais foram inoculados com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (cepa 232) pela via endotraqueal com auxílio de sonda.



Figura 2. Vacina comercial M+PAC® (MSD Saúde Animal) (A); Vacina preparada com antígeno + SBA-15 (B); Local de aplicação da vacina (C).

4.2. Seleção dos animais e delineamento experimental

Trinta e seis leitões desmamados (20 dias de idade), machos e fêmeas, com peso médio variando de 5 a 7 Kg, foram adquiridos de uma granja conhecida como livre de *M. hyopneumoniae* e que atendeu os parâmetros mínimos de biosseguridade (Ramirez e Karrier, 2012). Os animais recebidos foram alojados em baias de creche nas dependências do Laboratório de Medicina de Suínos da FCAV/UNESP (Figura 3).



Figura 3. Animais alojados em baias de creche.

As instalações onde os animais foram alojados possuíam isolamento e normas de biossegurança para evitar alterações nos resultados da pesquisa. Os animais receberam ração de acordo com a fase de produção, sem adição de antibióticos e/ou aditivos, e água *ad libitum*. Os leitões foram pesados aos 21 dias de idade e foram distribuídos de forma homogênea dentro dos grupos experimentais, resultando em grupos com médias de peso similares.

Os animais receberam identificações individuais por meio de brincos, e foram distribuídos em três grupos experimentais que atenderam os seguintes protocolos:

- G1 (n=12) leitões imunizados com a vacina comercial de dose única aos 24 dias de idade (D0) pela via intramuscular;
- G2 (n=12) leitões imunizados com a vacina preparada (sílica SBA-15) de dose única aos 24 dias de idade (D0) pela via intramuscular;
- G3 (n=12) leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação de antígeno em solução de PBS (pH 7,4) aos 24 dias de idade (D0) pela via intramuscular.

Imediatamente antes a imunização (D0), todos os animais foram submetidos à coleta de sangue venoso para a obtenção do soro sanguíneo para a mensuração das imunoglobulinas (IgA e IgG) e proteínas de fase aguda (PFAs), visando a obtenção dos valores basais de cada variável.

A vacina comercial escolhida para o estudo foi a M+PAC® (MSD Saúde Animal). Todos os animais foram desafiados aos 45 dias de idade (D21) com 5 mL

de meio de cultura contendo 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (cepa 232), administrada com auxílio de uma sonda orotraqueal.

Novas colheitas de amostras de sangue venoso foram realizadas 24 horas após a imunização dos animais (D1), 21 dias após a imunização (D21), e 14 dias após o desafio com *M. hyopneumoniae* (D35) (Figura 4).

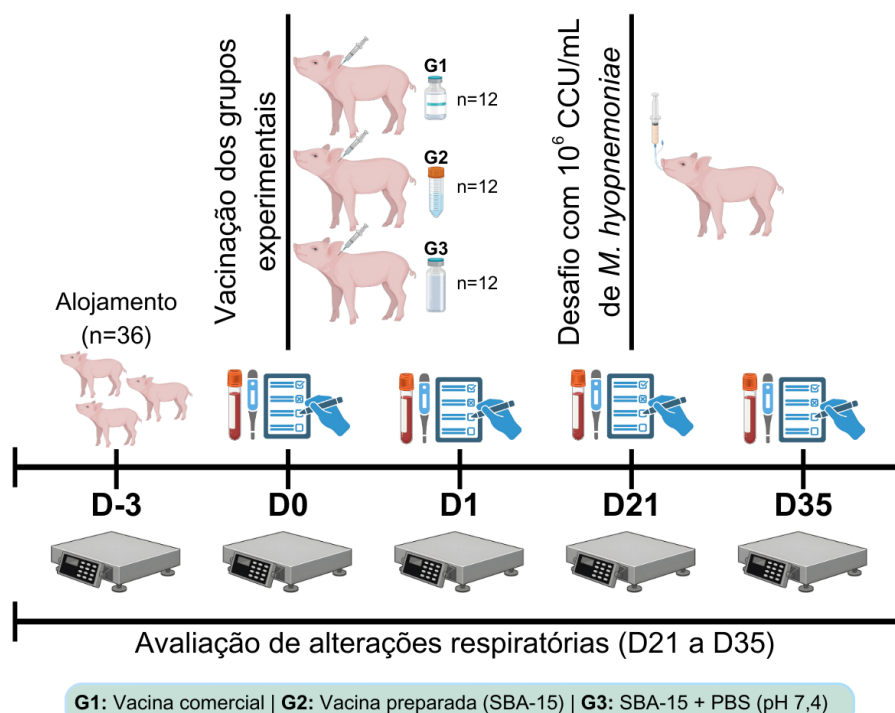


Figura 4. Delineamento experimental do projeto.

Todos os protocolos descritos neste projeto de pesquisa foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal (protocolo n°003841/23).

4.3. Exame físico

Imediatamente antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a imunização e antes do desafio experimental com *M. hyopneumoniae* (D21) e 14 dias após o desafio (D35) foram realizadas a aferição da temperatura retal e a pesagem dos animais (Feitosa, 2020). Entre D1 a D4 foi realizada a inspeção do local da aplicação das vacinas, em busca de reações inflamatórias e lesões cutâneas. A avaliação das alterações respiratórias, por

meio do escore de tosse dos animais (em repouso e em exercício) foi realizada após a infecção experimental, entre D22 a D35 (Halbur *et al.*, 1996).

4.4. Colheita das amostras de sangue

A colheita das amostras de sangue foi realizada mediante a punção da veia jugular, após antissepsia com álcool 70%, utilizando-se o sistema de colheita a vácuo (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA). Foram colhidas amostras de 10 mL de sangue (Figura 5), em tubos sem anticoagulante, nos momentos descritos anteriormente (D0, D1, D21 e D35).



Figura 5. Colheita de sangue por punção da veia jugular com sistema a vácuo.

Após a retração do coágulo, as amostras de sangue foram centrifugadas a 1.500 x g durante 10 minutos, obtendo-se alíquotas de 1,5 mL de soro, que foram armazenadas em tubos tipo *Eppendorf*, previamente identificados, e congeladas (-20°C) até o momento da realização das análises laboratoriais.

4.5. Análises laboratoriais

4.5.1. Proteinograma sérico

O fracionamento proteico foi realizado pelo método de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo técnica proposta por Laemmli (1970). Após o fracionamento, o gel foi corado durante 10 minutos em solução de azul de coomassie 0,25% e, posteriormente, descorado

em solução de ácido acético 7% para retirar o excesso de corante, até que as frações proteicas se apresentassem nítidas. As concentrações dessas proteínas foram determinadas em densitômetro computadorizado (Shimadzu CS-9301 PC, Tokyo, Japan). Como referência, foi utilizada uma solução marcadora (Sigma, St Louis, MO, USA) com diferentes pesos moleculares, além das proteínas purificadas transferrina, haptoglobina, ceruloplasmina, α 1-antitripsina e IgG suína (Figura 6).

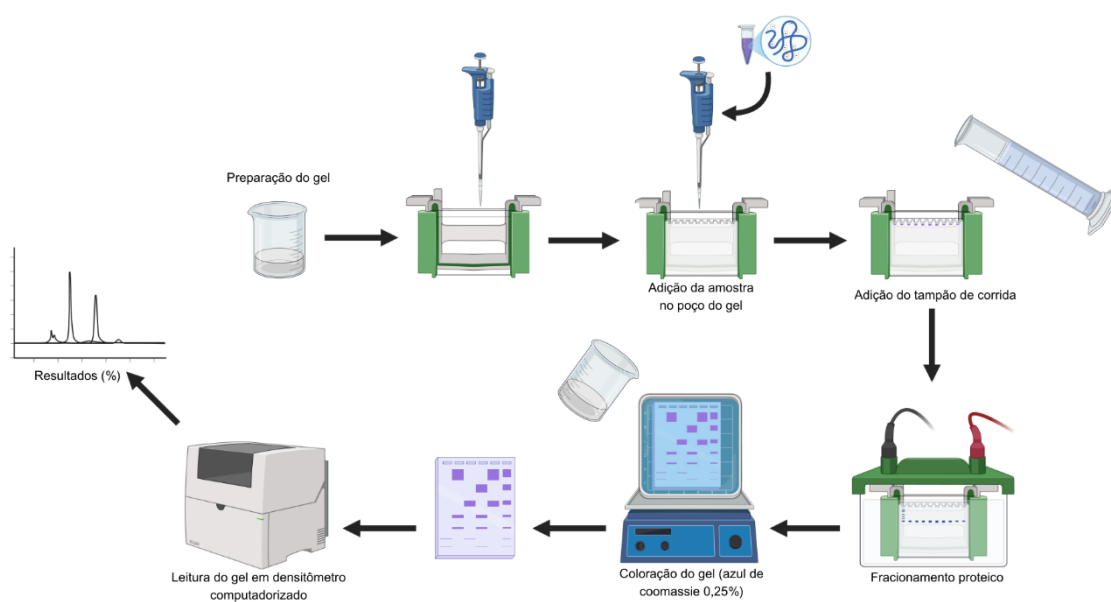


Figura 6. Representação esquemática do fracionamento das proteínas séricas pela técnica de SDS-PAGE.

A concentração sérica de proteínas totais foi determinada pelo método do biureto em espectrofotômetro semiautomático (Labquest, Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), utilizando-se conjunto de reagentes comerciais (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) (Figura 7).

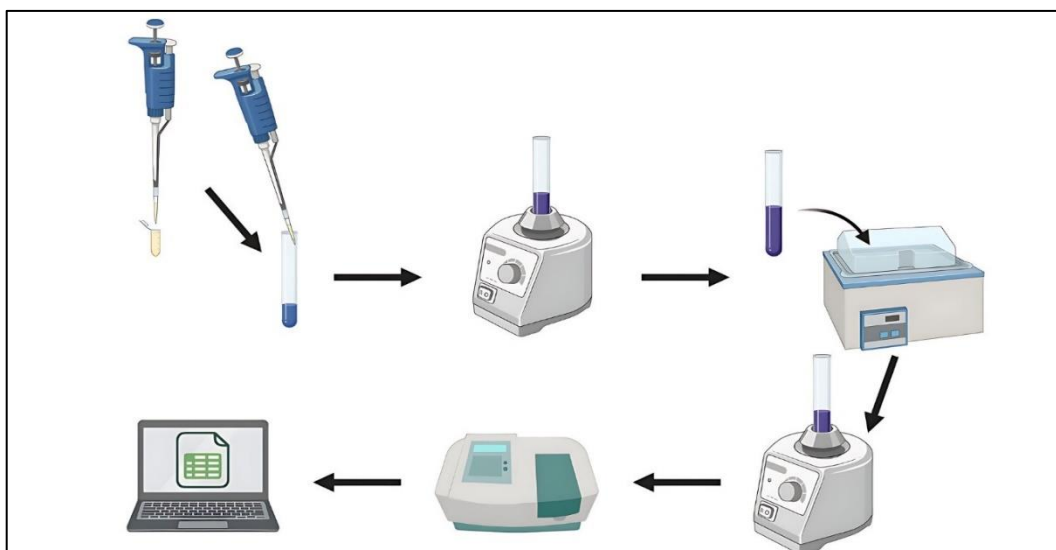


Figura 7. Representação esquemática da dosagem da concentração sérica de proteínas totais pelo método do biureto em espectrofotômetro semiautomático.

4.6. Análise estatística

Após a verificação da normalidade das variáveis estudadas, pelo teste de Shapiro-Wilk, foi realizada a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para a comparação entre os grupos nos diferentes momentos ($p < 0,05$), para as variáveis que apresentaram distribuição normal, e o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn ($p < 0,05$), para as variáveis que não apresentaram distribuição normal. A correlação entre as variáveis do proteinograma sérico foi realizada por meio da aplicação do coeficiente de correlação de Pearson (r). Considerou-se o escore fraco ($0,01 \leq r \leq 0,39$), moderado ($0,40 \leq r \leq 0,69$) e forte ($0,70 \leq r \leq 1,00$) para a classificação do nível de correlação entre as variáveis. O nível de significância considerado foi de 5%. O software GraphPad Prism versão 8.4.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) foi utilizado para análise dos dados.

5. Resultados

5.1. Exame físico

Os resultados do exame físico dos leitões (temperatura retal, peso, alterações respiratórias e alterações no local de aplicação) são mostrados nas Tabelas 1 a 4 e nas Figuras 8 a 10.

Em relação à temperatura retal dos animais, foi possível identificar diferenças significativas entre os grupos em três momentos (D0, D1 e D35), sendo as maiores médias observadas nos leitões do G1 em D1 (39,52°C). Entre D0 e D1 houve aumento da temperatura retal nos três grupos avaliados, seguido de redução da temperatura entre D1 e D21 e novo aumento entre D21 e D35 (Tabela 1 e Figura 8).

Tabela 1. Média $\pm$ desvio padrão da **temperatura retal (°C)** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação do antígeno (G3), por via intramuscular, antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a vacinação e antes da inoculação endotraqueal com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D21), e 14 dias após o desafio (D35).

Grupos	Momentos			
	D0	D1	D21	D35
G1	38,31 $\pm$ 0,41 ^{Aac}	39,52 $\pm$ 0,45 ^{Ab}	38,16 $\pm$ 0,43 ^{Aa}	38,78 $\pm$ 0,29 ^{Ac}
G2	38,27 $\pm$ 0,44 ^{Aac}	38,98 $\pm$ 0,39 ^{Bb}	38,06 $\pm$ 0,42 ^{Aac}	38,48 $\pm$ 0,27 ^{ABbc}
G3	38,83 $\pm$ 0,22 ^{Ba}	39,13 $\pm$ 0,30 ^{ABa}	38,17 $\pm$ 0,38 ^{Ab}	38,38 $\pm$ 0,32 ^{Bb}

Valores seguidos da mesma letra maiúscula na coluna ou minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

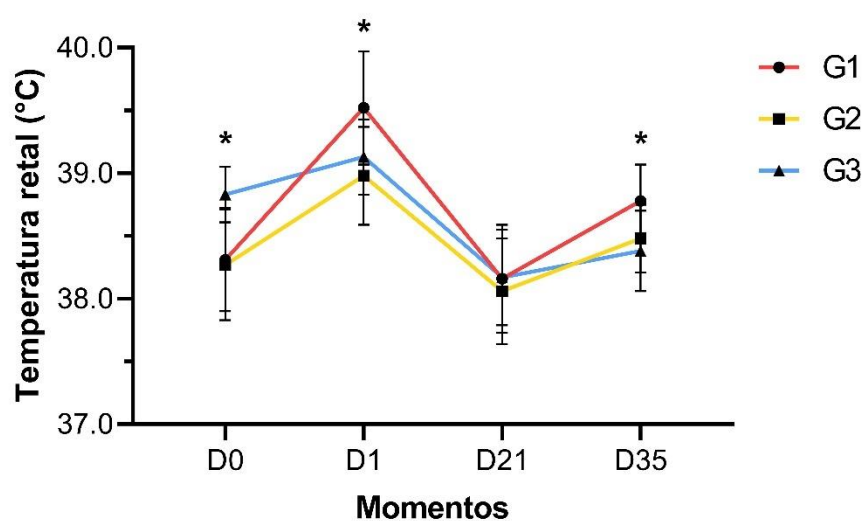


Figura 8. Representação gráfica dos valores médios da **temperatura retal (°C)** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação do antígeno (G3), por via intramuscular, antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a vacinação e antes da inoculação endotraqueal com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D21), e 14 dias após o desafio (D35). * $p < 0,05$.

Em relação ao peso dos leitões, não foram observadas diferenças significativas entre os três grupos ao longo do período experimental ($p > 0,05$). O G3 apresentou maior peso médio ao final do experimento (D35; 11,03 Kg) (Tabela 2 e Figura 9).

Tabela 2. Média $\pm$ desvio padrão do **peso (Kg)** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação do antígeno (G3), por via intramuscular, antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a vacinação e antes da inoculação endotraqueal com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D21), e 14 dias após o desafio (D35).

Grupos	Momentos			
	D0	D1	D21	D35
G1	6,14 $\pm$ 0,51 ^{Aa}	6,27 $\pm$ 0,52 ^{Aa}	7,94 $\pm$ 0,81 ^{Ab}	10,68 $\pm$ 1,33 ^{Ac}
G2	6,23 $\pm$ 0,48 ^{Aa}	6,35 $\pm$ 0,47 ^{Aa}	7,83 $\pm$ 0,58 ^{Ab}	10,37 $\pm$ 1,09 ^{Ac}
G3	6,38 $\pm$ 0,48 ^{Aa}	6,52 $\pm$ 0,49 ^{Aa}	8,12 $\pm$ 0,60 ^{Ab}	11,03 $\pm$ 0,84 ^{Ac}

Valores seguidos da mesma letra maiúscula na coluna ou minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

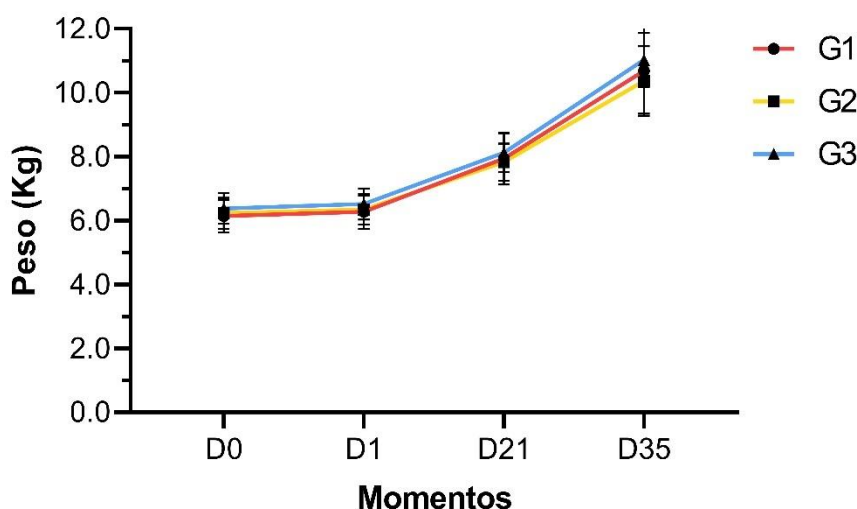


Figura 9. Representação gráfica dos valores médios do **peso (Kg)** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação do antígeno (G3), por via intramuscular, antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a vacinação e antes da inoculação endotraqueal com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D21), e 14 dias após o desafio (D35).

Também não foi verificada diferença significativa no ganho de peso diário (GPD) dos leitões dos três grupos experimentais ($p>0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Média $\pm$ desvio padrão do **ganho de peso diário - GPD (Kg)** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação de antígeno (G3), por via intramuscular, ao longo do período experimental.

Grupos	GPD (Kg)
G1	0,13 $\pm$ 0,03 ^A
G2	0,12 $\pm$ 0,03 ^A
G3	0,13 $\pm$ 0,02 ^A

Valores seguidos de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

A avaliação das alterações respiratórias, por meio do escore de tosse dos animais (em repouso e em exercício), foi realizada após a infecção experimental, entre D21 e D35, sendo constatada a presença de tosse entre os leitões a partir de D31. Não foi possível identificar diferenças significativas entre os grupos experimentais nesses momentos ($p>0,05$). Os leitões do G2 apresentaram as menores médias de escores de tosse entre D31 e D35 (Tabela 4 e Figura 10).

Tabela 4. Média $\pm$ desvio padrão dos **escores de alteração respiratória** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação do antígeno (G3), por via intramuscular, 10 a 14 dias após o desafio endotraqueal com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D31 a D35).

Grupos	Momentos				
	D31	D32	D33	D34	D35
G1	0,17 $\pm$ 0,28 ^{Aa}	0,33 $\pm$ 0,44 ^{Aa}	0,33 $\pm$ 0,50 ^{Aa}	0,25 $\pm$ 0,38 ^{Aa}	0,25 $\pm$ 0,42 ^{Aa}
G2	0,08 $\pm$ 0,15 ^{Aa}	0,08 $\pm$ 0,15 ^{Aa}	0,08 $\pm$ 0,15 ^{Aa}	0,08 $\pm$ 0,15 ^{Aa}	0,25 $\pm$ 0,42 ^{Aa}
G3	0,17 $\pm$ 0,28 ^{Aa}	0,25 $\pm$ 0,38 ^{Aa}	0,25 $\pm$ 0,38 ^{Aa}	0,33 $\pm$ 0,44 ^{Aa}	0,33 $\pm$ 0,50 ^{Aa}

Escore de alteração respiratória: 0 = ausência de tosse; 1 = tosse leve, 2 = tosse moderada e 3 = tosse intensa. Valores seguidos da mesma letra maiúscula na coluna ou minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Dunn ($p > 0,05$).

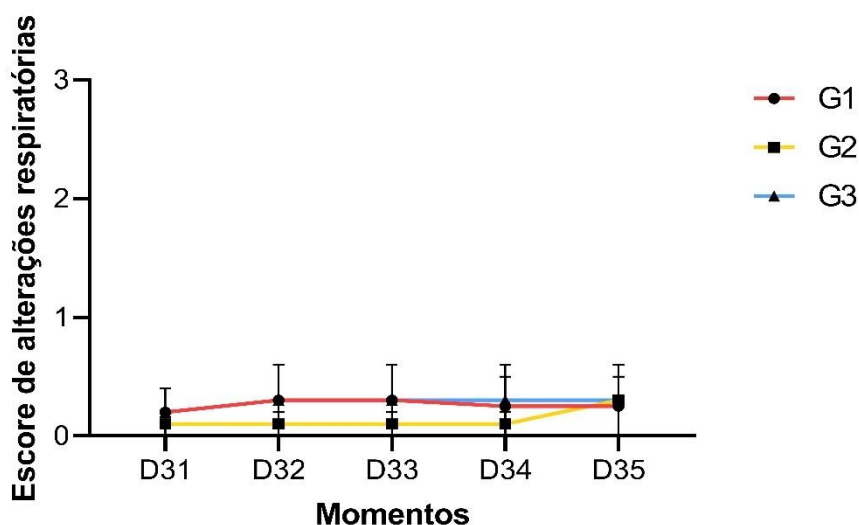


Figura 10. Representação gráfica dos valores médios dos **escores de alteração respiratória** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e com vacina de SBA-15 sem a incorporação de antígeno (G3) 10 a 14 dias após o desafio endotraqueal com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D31 a D35). Escores de alteração respiratória: 0 = ausência de tosse; 1 = tosse leve, 2 = tosse moderada e 3 = tosse intensa.

Em relação à inspeção do local onde foi feita a aplicação das vacinas nos leitões, não foram observadas alterações cutâneas, como edema, eritema, formação de nódulos, abscessos, feridas, ou a presença de dor em nenhum dos animais dos três grupos experimentais nos dias seguintes após a imunização.

5.2. Proteinograma sérico

Os resultados do fracionamento das proteínas séricas dos leitões pela técnica de SDS-PAGE e da concentração sérica de proteínas totais são mostrados nas Tabelas 5 a 15 e nas Figuras 11 a 20.

Em relação à concentração sérica de IgA, foi possível identificar diferenças significativas entre os três grupos nos momentos D21 e D35 ($p < 0,05$), sendo as maiores médias observadas nos animais do G3 no momento D21 (137,07 mg/dL). Entre D0 e D1 houve aumento da concentração sérica de IgA nos três grupos avaliados, seguido de aumento da concentrações entre D1 e D21 no G1 e G3 e redução da concentração em G2. Entre D21 e D35 houve redução da concentração sérica de IgA nos três grupos experimentais (Tabela 5 e Figura 11).

Tabela 5. Média $\pm$ desvio padrão da **concentração sérica de IgA (mg/dL)** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação do antígeno (G3), por via intramuscular, antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a vacinação e antes da inoculação endotraqueal com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D21), e 14 dias após o desafio (D35).

Grupos	Momentos			
	D0	D1	D21	D35
G1	107,30 $\pm$ 16,90 ^{Aa}	108,64 $\pm$ 24,19 ^{Aa}	111,09 $\pm$ 13,82 ^{Aa}	90,25 $\pm$ 17,35 ^{Aa}
G2	97,20 $\pm$ 20,62 ^{Aa}	130,48 $\pm$ 14,06 ^{Ab}	118,37 $\pm$ 13,69 ^{ABab}	100,42 $\pm$ 21,76 ^{ABa}
G3	109,54 $\pm$ 8,43 ^{Aa}	133,96 $\pm$ 13,26 ^{Ab}	137,07 $\pm$ 19,13 ^{Bb}	116,95 $\pm$ 16,32 ^{Bab}

Valores seguidos da mesma letra maiúscula na coluna ou minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

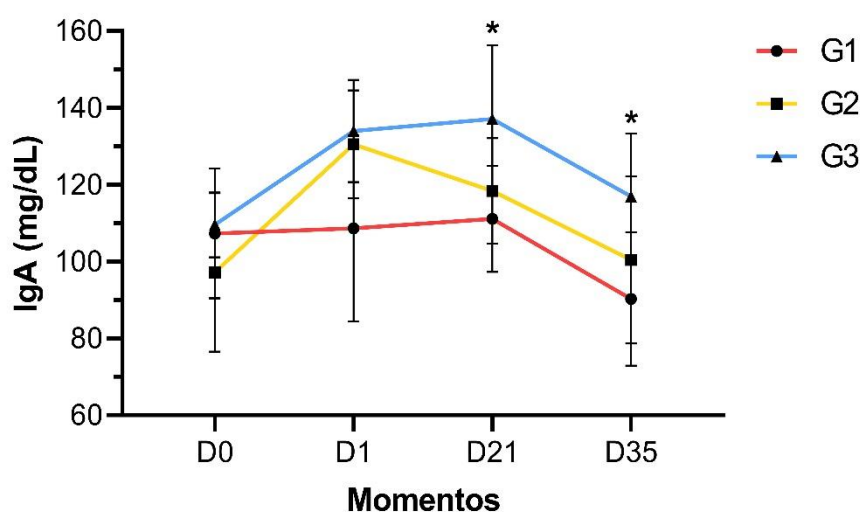


Figura 11. Representação gráfica dos valores médios da **concentração sérica de IgA (mg/dL)** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação do antígeno (G3), por via intramuscular, antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a vacinação e antes da inoculação endotraqueal com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D21), e 14 dias após o desafio (D35). * $p < 0,05$.

Foram observadas diferenças significativas da concentração sérica de IgG entre os três grupos apenas no momento D21 ($p < 0,05$), sendo as maiores médias observadas nos leitões do G1 nesse mesmo momento (1060,05 mg/dL). Entre D0 e D1 houve aumento da concentração sérica de IgG no G1 e G2 e redução da concentração no G3. Entre D1 e D21 houve aumento da concentração nos três grupos avaliados e entre D21 e D35 houve redução da concentração no G1 e G2 e aumento no G3 (Tabela 6 e Figura 12).

Tabela 6. Média $\pm$ desvio padrão da **concentração sérica de IgG (mg/dL)** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação do antígeno (G3), por via intramuscular, antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a vacinação e antes da inoculação endotraqueal com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D21), e 14 dias após o desafio (D35).

Grupos	Momentos			
	D0	D1	D21	D35
G1	641,66 $\pm$ 155,63 ^{Aa}	687,55 $\pm$ 102,63 ^{Aa}	1060,05 $\pm$ 120,25 ^{Ab}	990,01 $\pm$ 140,32 ^{Ab}
G2	603,88 $\pm$ 161,32 ^{Aa}	626,01 $\pm$ 166,58 ^{Aac}	855,52 $\pm$ 128,25 ^{Bb}	842,07 $\pm$ 171,23 ^{Abc}
G3	736,99 $\pm$ 176,21 ^{Aab}	605,41 $\pm$ 164,79 ^{Aa}	881,59 $\pm$ 128,70 ^{Bb}	934,55 $\pm$ 124,05 ^{Ab}

Valores seguidos da mesma letra maiúscula na coluna ou minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

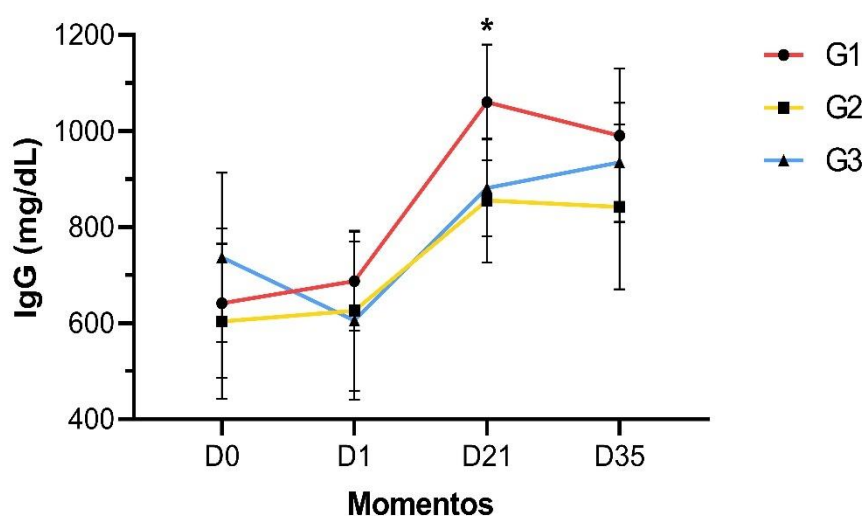


Figura 12. Representação gráfica dos valores médios da **concentração sérica de IgG (mg/dL)** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação do antígeno (G3), por via intramuscular, antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a vacinação e antes da inoculação endotraqueal com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D21), e 14 dias após o desafio (D35). * $p < 0,05$.

Em relação à concentração sérica de ceruloplasmina, foram notadas diferenças significativas entre os três grupos nos momentos D1 e D21 ($p < 0,05$), sendo as maiores médias observadas nos animais do G1 em D1 (79,37 mg/dL). Entre D0 e D1 houve aumento da concentração sérica de ceruloplasmina nos três grupos avaliados, seguido de redução da concentração entre D1 e D21 e novo aumento entre D21 e D35 (Tabela 7 e Figura 13).

Tabela 7. Média $\pm$ desvio padrão da **concentração sérica de ceruloplasmina (mg/dL)** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação do antígeno (G3), por via intramuscular, antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a vacinação e antes da inoculação endotraqueal com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D21), e 14 dias após o desafio (D35).

Grupos	Momentos			
	D0	D1	D21	D35
G1	44,34 $\pm$ 6,88 ^{Aa}	79,37 $\pm$ 16,34 ^{Ab}	38,12 $\pm$ 8,16 ^{Aba}	43,94 $\pm$ 6,94 ^{Aa}
G2	39,93 $\pm$ 9,24 ^{Aa}	55,66 $\pm$ 6,64 ^{Bb}	33,79 $\pm$ 6,39 ^{Aa}	55,80 $\pm$ 12,69 ^{Ab}
G3	38,22 $\pm$ 6,86 ^{Aa}	49,91 $\pm$ 8,23 ^{Bab}	47,35 $\pm$ 12,98 ^{Bab}	56,40 $\pm$ 9,70 ^{Ab}

Valores seguidos da mesma letra maiúscula na coluna ou minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

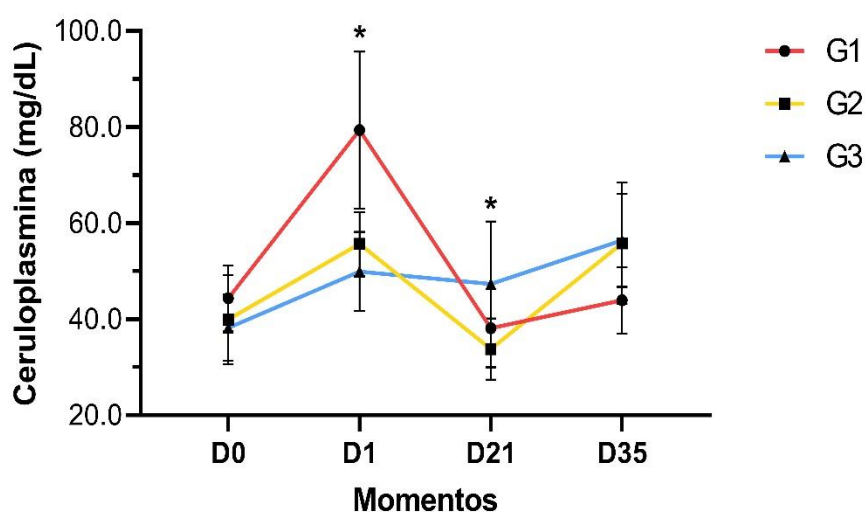


Figura 13. Representação gráfica dos valores médios da **concentração sérica de ceruloplasmina (mg/dL)** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação do antígeno (G3), por via intramuscular, antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a vacinação e antes da inoculação endotraqueal com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D21), e 14 dias após o desafio (D35). * $p < 0,05$.

Não foram verificadas diferenças significativas da concentração sérica de transferrina entre os leitões dos três grupos avaliados ao longo do período experimental ($p > 0,05$). Em todos os grupos houve diminuição da concentração desta proteína entre D0 e D1, seguida de aumento da concentração entre D1 e D21 e entre D21 e D35 (Tabela 8 e Figura 14).

Tabela 8. Média $\pm$ desvio padrão da **concentração sérica de transferrina (mg/dL)** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação do antígeno (G3), por via intramuscular, antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a vacinação e antes da inoculação endotraqueal com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D21), e 14 dias após o desafio (D35).

Grupos	Momentos			
	D0	D1	D21	D35
G1	298,58 $\pm$ 29,80 ^{Aab}	278,13 $\pm$ 28,60 ^{Aa}	332,66 $\pm$ 31,65 ^{Ab}	409,01 $\pm$ 30,86 ^{Ac}
G2	314,81 $\pm$ 45,66 ^{Aa}	285,10 $\pm$ 27,89 ^{Aa}	335,23 $\pm$ 36,22 ^{Aab}	393,11 $\pm$ 43,35 ^{Ab}
G3	304,22 $\pm$ 51,90 ^{Aab}	257,21 $\pm$ 36,70 ^{Aa}	351,36 $\pm$ 51,13 ^{Ab}	421,55 $\pm$ 34,79 ^{Ac}

Valores seguidos da mesma letra maiúscula na coluna ou minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

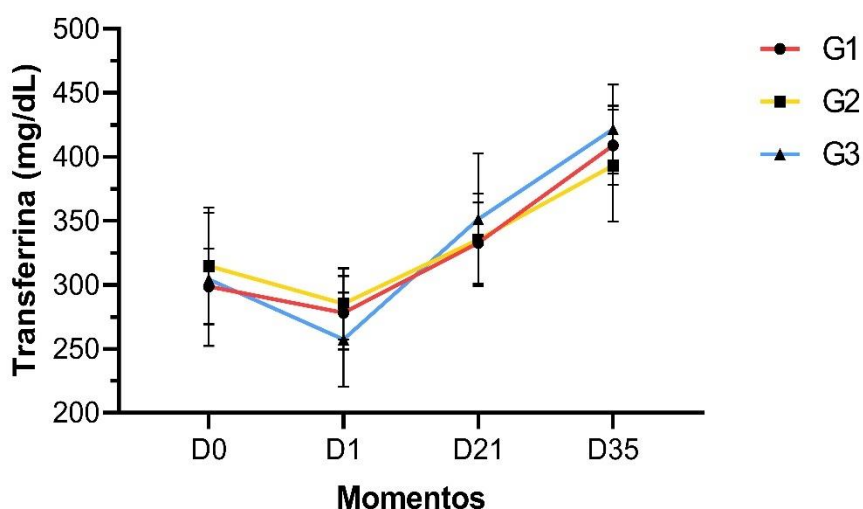


Figura 14. Representação gráfica dos valores médios da **concentração sérica de transferrina (mg/dL)** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação do antígeno (G3), por via intramuscular, antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a vacinação e antes da inoculação endotraqueal com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D21), e 14 dias após o desafio (D35).

Em relação à concentração sérica de albumina, também não foram identificadas diferenças significativas entre os animais dos três grupos experimentais nos quatro momentos avaliados ($p>0,05$). Em todos os grupos houve diminuição da concentração desta proteína ao longo do período experimental, exceto no G3 entre D21 e D35 (Tabela 9 e Figura 15).

Tabela 9. Média $\pm$ desvio padrão da **concentração sérica de albumina (g/dL)** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação do antígeno (G3), por via intramuscular, antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a vacinação e antes da inoculação endotraqueal com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D21), e 14 dias após o desafio (D35).

Grupos	Momentos			
	D0	D1	D21	D35
G1	3,93 $\pm$ 0,23 ^{Aa}	3,67 $\pm$ 0,16 ^{Aa}	3,05 $\pm$ 0,18 ^{Ab}	2,99 $\pm$ 0,18 ^{Ab}
G2	3,85 $\pm$ 0,13 ^{Aa}	3,69 $\pm$ 0,19 ^{Aa}	3,07 $\pm$ 0,19 ^{Ab}	2,95 $\pm$ 0,14 ^{Ab}
G3	3,80 $\pm$ 0,28 ^{Aa}	3,48 $\pm$ 0,26 ^{Aa}	3,05 $\pm$ 0,18 ^{Ab}	3,11 $\pm$ 0,20 ^{Ab}

Valores seguidos da mesma letra maiúscula na coluna ou minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

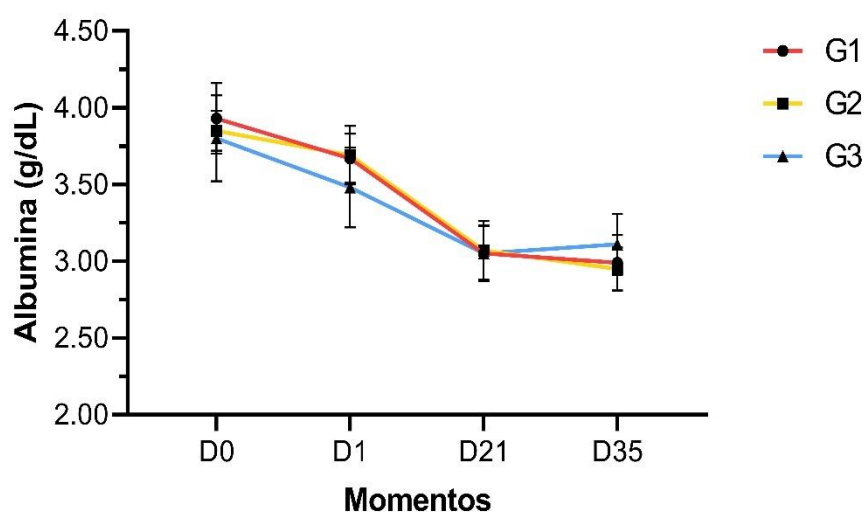


Figura 15. Representação gráfica dos valores médios da **concentração sérica de albumina (g/dL)** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação do antígeno (G3), por via intramuscular, antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a vacinação e antes da inoculação endotraqueal com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D21), e 14 dias após o desafio (D35).

No momento D0, não foi detectada a presença da proteína $\alpha 1$ -antitripsina nas amostras de soro sanguíneo de nenhum dos leitões dos três grupos avaliados. Esta proteína só foi observada a partir do momento D1 nos animais do G2 e G3 e a partir de D21 nos leitões do G1. Diferenças significativas da concentração sérica de $\alpha 1$ -antitripsina foram notadas entre os três grupos experimentais nos momentos D1 e D21, sendo as maiores médias observadas nos animais do G3 em D21 (296,83 mg/dL). Entre D0 e D1 houve aumento da concentração sérica de $\alpha 1$ -antitripsina no G2 e G3 seguido de aumento da concentração entre D1 e D21 e redução da concentração entre D21 e D35 no G1 e G3 e pequeno aumento no G2 (Tabela 10 e Figura 16).

Tabela 10. Média $\pm$ desvio padrão da **concentração sérica de α 1-antitripsina (mg/dL)** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação do antígeno (G3), por via intramuscular, antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a vacinação e antes da inoculação endotraqueal com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D21), e 14 dias após o desafio (D35).

Grupos	Momentos			
	D0	D1	D21	D35
G1	0 ± 0^a	0 ± 0^{Aa}	$172,96 \pm 63,33^{Ab}$	$83,72 \pm 111,63^{Aab}$
G2	0 ± 0^a	$45,63 \pm 60,84^{Aab}$	$208,38 \pm 55,23^{Ab}$	$220,07 \pm 77,61^{Ab}$
G3	0 ± 0^a	$102,29 \pm 68,19^{Bb}$	$296,83 \pm 43,65^{Bc}$	$158,01 \pm 105,34^{Ab}$

Valores seguidos da mesma letra maiúscula na coluna ou minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

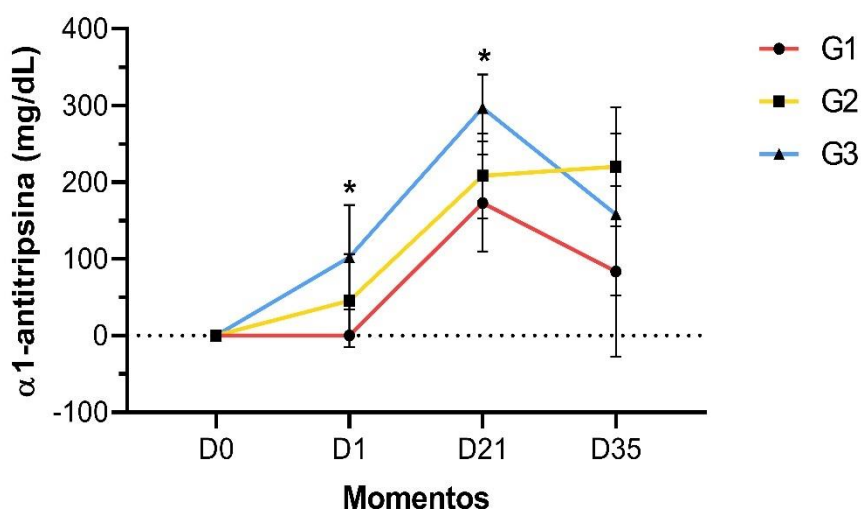


Figura 16. Representação gráfica dos valores médios da **concentração sérica de α 1-antitripsina (mg/dL)** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação do antígeno (G3), por via intramuscular, antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a vacinação e antes da inoculação endotraqueal com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D21), e 14 dias após o desafio (D35). * $p < 0,05$.

Foram notadas diferenças significativas da concentração sérica de haptoglobina entre os animais dos três grupos avaliados apenas no momento D1 ($p < 0,05$), sendo as maiores médias observadas nos animais do G1 no momento D1 (41,04 mg/dL). Entre D0 e D1 houve aumento da concentração sérica de haptoglobina no G1 e redução da concentração no G2 e G3. Entre D1 e D21 houve redução da concentração sérica de haptoglobina no G1 e aumento da concentração no G2 e G3 seguido de redução da concentração sérica nos três grupos avaliados entre D21 e D35 (Tabela 11 e Figura 17).

Tabela 11. Média $\pm$ desvio padrão da **concentração sérica de haptoglobina (mg/dL)** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação do antígeno (G3), por via intramuscular, antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a vacinação e antes da inoculação endotraqueal com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D21), e 14 dias após o desafio (D35).

Grupos	Momentos			
	D0	D1	D21	D35
G1	32,25 $\pm$ 11,30 ^{Aab}	41,04 $\pm$ 11,91 ^{Aa}	34,14 $\pm$ 8,13 ^{Aab}	21,04 $\pm$ 8,61 ^{Ab}
G2	33,78 $\pm$ 12,45 ^{Aa}	29,83 $\pm$ 14,7 ^{Aa}	37,81 $\pm$ 16,47 ^{Aa}	28,81 $\pm$ 17,98 ^{Aa}
G3	30,45 $\pm$ 10,93 ^{Aa}	13,62 $\pm$ 3,44 ^{Bb}	37,35 $\pm$ 15,83 ^{Aa}	21,59 $\pm$ 10,40 ^{Aab}

Valores seguidos da mesma letra maiúscula na coluna ou minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

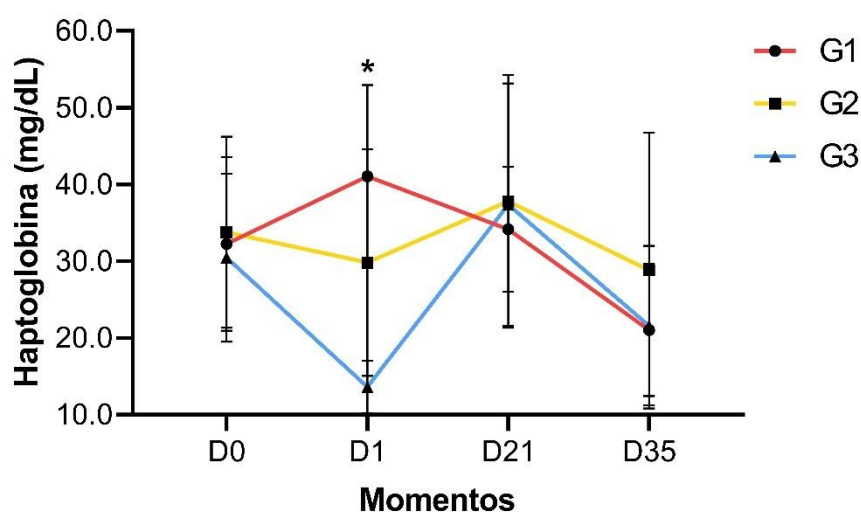


Figura 17. Representação gráfica dos valores médios da **concentração sérica de haptoglobina (mg/dL)** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação do antígeno (G3), por via intramuscular, antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a vacinação e antes da inoculação endotraqueal com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D21), e 14 dias após o desafio (D35). * $p < 0,05$.

Em relação à concentração sérica de $\alpha 1$ -glicoproteína ácida, foram verificadas diferenças significativas entre os leitões dos três grupos experimentais apenas no momento D0 ($p < 0,05$), sendo as maiores médias observadas nos animais do G3 (5,44 mg/dL). Enquanto que nos animais do G1 e G2 houve aumento da concentração sérica desta proteína entre D0 e D1, nos leitões do G3 houve diminuição da concentração. Entre D1 e D21 houve diminuição da concentração sérica de $\alpha 1$ -glicoproteína ácida seguida por aumento da concentração sérica nos animais dos três grupos experimentais (Tabela 12 e Figura 18).

Tabela 5. Média $\pm$ desvio padrão da **concentração sérica de α 1-glicoproteína ácida (mg/dL)** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação do antígeno (G3), por via intramuscular, antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a vacinação e antes da inoculação endotraqueal com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D21), e 14 dias após o desafio (D35).

Grupos	Momentos			
	D0	D1	D21	D35
G1	2,56 $\pm$ 1,48 ^{Aa}	4,26 $\pm$ 1,27 ^{Aab}	2,60 $\pm$ 0,82 ^{Aa}	4,69 $\pm$ 1,11 ^{Ab}
G2	2,80 $\pm$ 1,45 ^{ABa}	4,63 $\pm$ 1,76 ^{Aab}	2,45 $\pm$ 0,50 ^{Aa}	7,04 $\pm$ 4,64 ^{Ab}
G3	4,61 $\pm$ 1,38 ^{Bac}	3,19 $\pm$ 0,91 ^{Aab}	2,87 $\pm$ 0,94 ^{Ab}	5,44 $\pm$ 1,61 ^{Ac}

Valores seguidos da mesma letra maiúscula na coluna ou minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

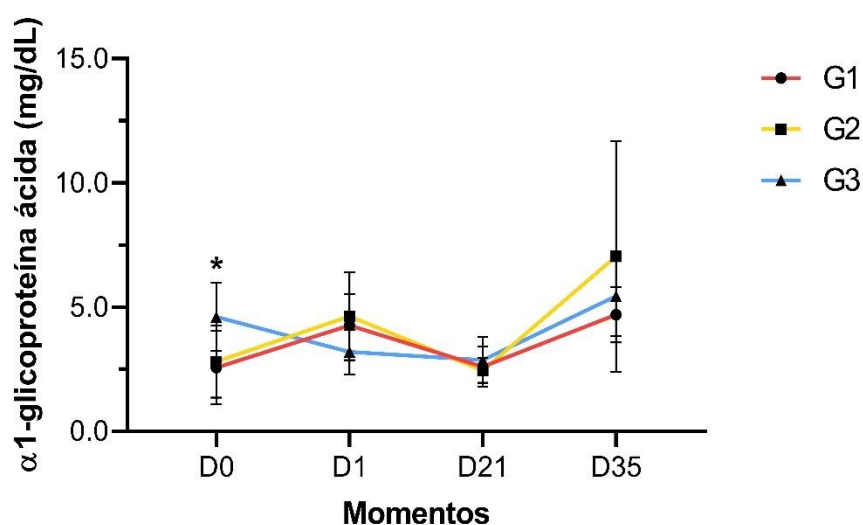


Figura 18. Representação gráfica dos valores médios da **concentração sérica de α 1-glicoproteína ácida (mg/dL)** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação do antígeno (G3), por via intramuscular, antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a vacinação e antes da inoculação oral com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D21), e 14 dias após o desafio (D35). * $p < 0,05$.

Foram observadas diferenças significativas da concentração sérica da proteína PM 23.000 Da entre os animais dos três grupos avaliados apenas no momento D1 ($p < 0,05$), sendo as maiores médias notadas nos animais do G1 em D35 (241,51 mg/dL). Entre D0 e D1 houve redução da concentração sérica desta proteína entre os leitões dos três grupos experimentais seguida de aumento da concentração entre D1 e D21 e entre D21 e D35 (Tabela 13 e Figura 19).

Tabela 13. Média $\pm$ desvio padrão da concentração sérica da proteína de PM 23.000 Da (mg/dL) de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação do antígeno (G3), por via intramuscular, antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a vacinação e antes da inoculação endotraqueal com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D21), e 14 dias após o desafio (D35).

Grupos	Momentos			
	D0	D1	D21	D35
G1	81,36 $\pm$ 15,05 ^{Aa}	31,85 $\pm$ 10,54 ^{Ab}	66,73 $\pm$ 13,56 ^{Aa}	241,51 $\pm$ 30,54 ^{Ac}
G2	89,36 $\pm$ 18,71 ^{Aa}	56,73 $\pm$ 15,55 ^{Bb}	60,12 $\pm$ 6,52 ^{Ab}	228,36 $\pm$ 27,52 ^{Ac}
G3	81,00 $\pm$ 11,90 ^{Aa}	47,91 $\pm$ 8,77 ^{Bb}	62,28 $\pm$ 12,26 ^{Aab}	221,09 $\pm$ 23,43 ^{Ac}

Valores seguidos de mesma letra minúscula na linha ou maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

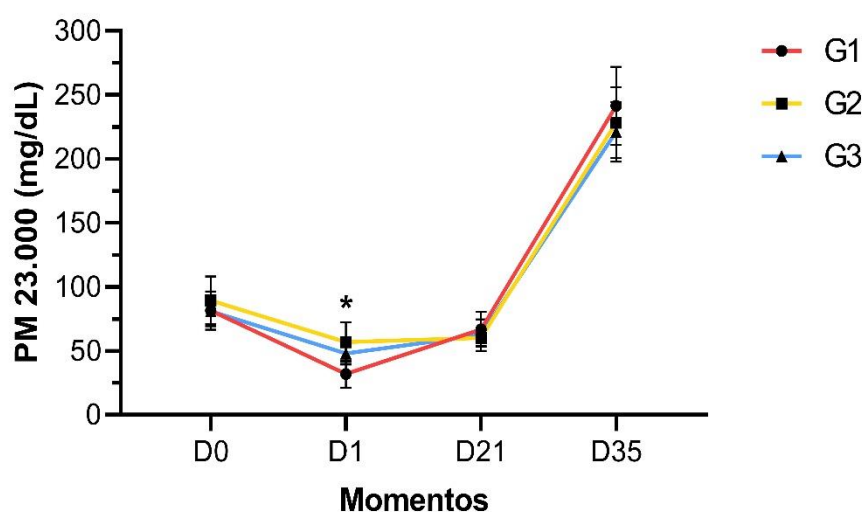


Figura 19. Representação gráfica dos valores médios de **concentração sérica da proteína de PM 23.000 Da (mg/dL)** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação do antígeno (G3), por via intramuscular, antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a vacinação e antes da inoculação endotraqueal com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D21), e 14 dias após o desafio (D35). * $p < 0,05$.

Em relação à concentração sérica de proteínas totais, não foram verificadas diferenças significativas entre os leitões dos três grupos avaliados ao longo do período experimental. Entre D0 e D1 houve redução da concentração sérica das proteínas totais nos três grupos experimentais seguida de aumento da concentração entre D1 e D21 no G1 e G3 e redução no G2. Entre D21 e D35 houve redução da concentração sérica das proteínas totais no G1 e aumento no G2 e G3 (Tabela 14 e Figura 20).

Tabela 20. Média $\pm$ desvio padrão da **concentração sérica de proteínas totais (g/dL)** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação do antígeno (G3), por via intramuscular, antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a vacinação e antes da inoculação endotraqueal com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D21), e 14 dias após o desafio (D35).

Grupos	Momentos			
	D0	D1	D21	D35
G1	5,24 $\pm$ 0,35 ^{Aa}	5,04 $\pm$ 0,20 ^{Aa}	5,07 $\pm$ 0,31 ^{Aa}	5,02 $\pm$ 0,23 ^{Aa}
G2	5,14 $\pm$ 0,19 ^{Aa}	5,06 $\pm$ 0,28 ^{Aa}	4,91 $\pm$ 0,28 ^{Aa}	5,05 $\pm$ 0,31 ^{Aa}
G3	5,18 $\pm$ 0,24 ^{Aa}	4,83 $\pm$ 0,19 ^{Ab}	5,07 $\pm$ 0,19 ^{Aab}	5,20 $\pm$ 0,31 ^{Aa}

Valores seguidos da mesma letra maiúscula na coluna ou minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

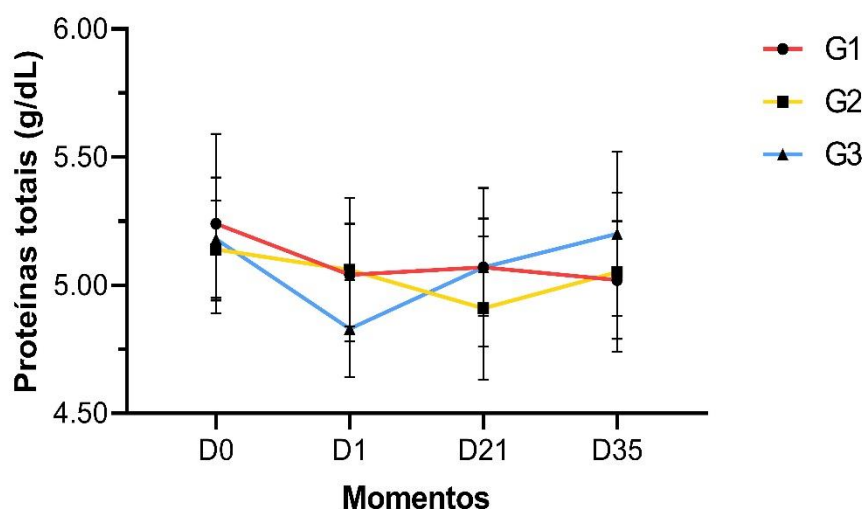


Figura 20. Representação gráfica dos valores médios da **concentração sérica de proteínas totais (mg/dL)** de leitões imunizados com vacina comercial contra *M. hyopneumoniae* (G1), vacina preparada com sílica SBA-15 (G2), e leitões que receberam a sílica SBA-15 sem a incorporação do antígeno (G3), por via intramuscular, antes da imunização (D0), 24 horas após a imunização (D1), 21 dias após a vacinação e antes da inoculação endotraqueal com 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae* (D21), e 14 dias após o desafio (D35).

Foram observadas correlações significativas entre as concentrações séricas de imunoglobulinas e proteínas de fase aguda (PFAs) dos leitões vacinados e desafiados com *M. hyopneumoniae* ($p < 0,05$) (Tabela 14).

Em relação às imunoglobulinas, foram verificadas correlações positivas fracas entre as concentrações séricas de IgA e ceruloplasmina ($r = 0,17998$; $p = 0,0309$), IgA e $\alpha 1$ -antitripsina ($r = 0,22712$; $p = 0,0062$), IgG e transferrina ($r = 0,37717$; $p < 0,0001$), IgG e $\alpha 1$ -antitripsina ($r = 0,29161$; $p = 0,0004$) e IgG e proteínas totais ($r = 0,32716$; $p < 0,0001$); correlação positiva moderada entre IgG e PM 23.000 Da ($r = 0,40891$; $p < 0,0001$); correlação negativa fraca entre IgA e PM 23.000 Da ($r = -0,29439$; $p = 0,0003$); e correlação negativa moderada entre IgG e albumina ($r = -0,52126$; $p < 0,0001$) (Tabela 14).

Quanto às PFAs, foram notadas correlações positivas fracas entre as concentrações séricas de ceruloplasmina e haptoglobina ($r = 0,27737$; $p = 0,0008$), ceruloplasmina e proteínas totais ($r = 0,20397$; $p = 0,0142$), haptoglobina e proteínas totais ($r = 0,36631$; $p < 0,0001$) e PM 23.000 Da e proteínas totais ($r = 0,21599$; $p = 0,0093$); e correlação negativa fraca entre haptoglobina e PM 23.000 Da ($r = -0,17065$; $p = 0,0409$) (Tabela 14).

Tabela 14. Coeficiente de correlação de Pearson (r) e valor de p entre as concentrações séricas de imunoglobulinas e proteínas de fase aguda de leitões vacinados e desafiados com *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Parâmetros	IgG	Cerul	Transf	Alb	Anti	Hapto	AGA	PM23	PT
IgA	r = -0,11370 p = 0,1748	r = 0,17998 p = 0,0309	r = -0,13668 p = 0,1023	r = 0,09043 p = 0,2828	r = 0,22712 p = 0,0062	r = 0,01127 p = 0,8933	r = -0,05074 p = 0,5459	r = -0,29439 p = 0,0003	r = 0,13839 p = 0,0981
	IgG	r = -0,13509 p = 0,1065	r = 0,37717 p < 0,0001	r = -0,52126 p < 0,0001	r = 0,29161 p = 0,0004	r = 0,10732 p = 0,2004	r = 0,09947 p = 0,2355	r = 0,40891 p < 0,0001	r = 0,32716 p < 0,0001
		Cerul	r = 0,05195 p = 0,5363	r = 0,16183 p = 0,0535	r = -0,07826 p = 0,3511	r = 0,27737 p = 0,0008	r = 0,09510 p = 0,2569	r = 0,02608 p = 0,7563	r = 0,20397 p = 0,0142
			Transf	r = -0,32224 p < 0,0001	r = 0,27534 p = 0,0008	r = 0,04634 p = 0,5813	r = 0,14153 p = 0,0906	r = 0,62665 p < 0,0001	r = 0,31975 p < 0,0001
				Alb	r = -0,66683 p < 0,0001	r = 0,16293 p = 0,0519	r = -0,04768 p = 0,5718	r = -0,37502 p < 0,0001	r = 0,49482 p < 0,0001
					Anti	r = 0,03584 p = 0,6698	r = -0,11558 p = 0,1677	r = 0,15975 p = 0,0558	r = -0,05329 p = 0,5258
						Hapto	r = -0,11465 p = 0,1712	r = -0,17065 p = 0,0409	r = 0,36631 p < 0,0001
							AGA	r = 0,30314 p = 0,0002	r = 0,06613 p = 0,4310
								PM23	r = 0,21599 p = 0,0093
									PT

IgA; imunoglobulina A; IgG: imunoglobulina G; Cerul: ceruloplasmina; Transf: transferrina, Alb: albumina; Anti: α 1-antitripsina; hapto: haptoglobina; AGA: α 1-glicoproteína ácida; PM23: PM 23.000 Da; PT: proteínas totais.

6. Discussão

Mycoplasma hyopneumoniae é um dos patógenos mais importantes para a produção mundial de suínos causando grandes perdas econômicas, visto que causa ciliostase e destruição das células do epitélio respiratório, favorecendo a colonização do trato respiratório por outros microrganismos patogênicos. Devido à sua importância, novas tecnologias na fabricação de vacinas e estudos sobre o impacto do agente no status sanitário do plantel se mostram de extrema importância, e para isso, a análise da concentração de imunoglobulinas e proteínas de fase aguda (PFAs) pode auxiliar a elucidar esses dois pontos

Assim, o presente estudo objetivou avaliar a imunogenicidade e o perfil das PFAs de suínos imunizados com uma vacina inativada produzida com a sílica mesoporada SBA-15 frente ao desafio experimental com *M. hyopneumoniae*.

Em relação aos resultados do exame físico, a temperatura retal dos animais dos três grupos experimentais ficaram dentro dos valores de normalidade para a espécie suína (Tabela 1 e Figura 8) e não foram constatadas alterações cutâneas no local de aplicação da vacina nos leitões do G2 e G3, indicando a ausência de efeitos colaterais causados pela utilização da sílica nanoestruturada SBA-15 e confirmando os achados de Trezena *et al.* (2022) e Storino *et al.* (2023) que observaram baixa toxicidade da sílica como adjuvante de vacinas. E, apesar de diversos estudos relatarem a eficácia e segurança da administração de vacinas contendo a sílica SBA-15 como adjuvante pela via oral (Scaramuzzi *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2023; Storino *et al.*, 2023), subcutânea (Scaramuzzi *et al.*, 2011; Trezena *et al.*, 2022) e intraperitoneal (Alves *et al.*, 2013), não foram encontrados na literatura trabalhos acerca da administração de vacinas contendo a sílica SBA-15 como adjuvante pela via intramuscular.

No presente estudo não foram observadas diferenças significativas no ganho de peso dos animais dos três grupos experimentais. Apesar de relatos da literatura sobre a melhora do desempenho em leitões imunizados com uma vacina contra *M. hyopneumoniae* (Yang *et al.*, 2021), outros estudos também não encontraram diferenças no ganho de peso diário e no peso dos animais (Um *et al.*, 2021), assim como o verificado no presente estudo (Tabelas 2 e 3 e Figura 9).

Apesar dos animais do G2 terem apresentado os menores escores de alteração respiratória, não foram notadas diferenças significativas entre os três

grupos experimentais (Tabela 4 e Figura 10), diferente do que foi observado por Suh, Oh e Chae (2022), indicando que provavelmente a diferença entre os resultados possa estar relacionada ao status imunitário dos animais antes da vacinação, dose do inóculo e patogenicidade do agente.

Em relação às concentrações séricas de imunoglobulinas, foi observada maior concentração sérica de IgA nos leitões que receberam a vacina preparada com sílica SBA-15 (G2) quando comparado com os leitões que receberam a vacina comercial (G1) (Tabela 5 e Figura 11). Por outro lado, os animais que receberam a vacina comercial apresentaram maiores concentrações séricas de IgG após a imunização (Tabela 6 e Figura 12). A IgG é a imunoglobulina encontrada em maior concentração no sangue, enquanto que a IgA é encontrada em grandes quantidades nas mucosas, principalmente na mucosa respiratória e gastrointestinal, sendo o isótipo mais importante na imunidade local (Tizard, 2014). De acordo com Maes *et al.* (2021), a IgG desempenha um papel de menor importância na proteção contra *M. hyopneumoniae* visto que o mesmo se adere aos cílios do epitélio do trato respiratório.

Vinte e quatro horas após a vacinação dos animais (D1), os leitões imunizados com vacina comercial (G1) apresentaram maiores concentrações séricas de ceruloplasmina e haptoglobina, enquanto que os leitões imunizados com a vacina preparada com sílica SBA-15 (G2) apresentaram maiores concentrações séricas de transferrina, albumina, α 1-glicoproteína ácida e proteína de PM de 23.000 Da. Catorze dias após o desafio com *M. hyopneumoniae* (D35) os leitões imunizados com vacina comercial (G1) apresentaram maiores concentrações séricas somente da proteína de PM 23.000 Da, enquanto que os leitões imunizados com a vacina preparada com sílica SBA-15 (G2) apresentaram maiores concentrações séricas de ceruloplasmina, α 1-antitripsina, haptoglobina e α 1-glicoproteína ácida (Tabelas 7 a 13 e Figuras 13 a 19). Apesar de terem sido observadas correlações significativas ($p < 0,05$) entre as concentrações séricas de imunoglobulinas e PFAs dos leitões vacinados e desafiados com *M. hyopneumoniae*, a maioria foi fraca, com exceção das correlações entre IgG e PM 23.000 Da ($r = 0,40891$) e entre IgG e albumina ($r = -0,52126$) que foram moderadas (Tabela 14).

As PFAs são um grupo de proteínas inflamatórias, com atividade inespecífica, que têm a função de inibir a continuidade do dano tecidual, isolando e destruindo o agente agressor e ativando o processo de reparação necessária para o retorno do organismo às funções normais (Cerón, Eckersall e Martínez-Subiela, 2005). Nos suínos, as PFAs que apresentam maior incremento frente a processos inflamatórios são amiloide A sérica, haptoglobina, proteína C reativa, α 1-glicoproteína ácida, ceruloplasmina e fibrinogênio (Murata, Shimada e Yoshika, 2004), sendo utilizadas para a detecção de infecções subclínicas, quantificação da magnitude de processos inflamatórios, avaliação de respostas vacinais e como indicadores de bem-estar animal nas criações suinícolas, uma vez que a concentração sérica das PFAs está estritamente ligada à gravidade do processo infeccioso/inflamatório (Cerón *et al.*, 2016).

De maneira semelhante, Ferreira *et al.* (2023), num estudo comparando a utilização de vacina comercial e vacina oral preparada com a sílica SBA-15 contra *M. hyopneumoniae*, verificaram maiores concentrações de ceruloplasmina, transferrina, albumina, haptoglobina, α 1-glicoproteína ácida e proteína de PM 23.000 Da um dia após a imunização dos leitões com vacina a oral contra *M. hyopneumoniae*. Uma semana após o desafio com o agente, os autores observaram maiores concentrações de ceruloplasmina, transferrina, albumina, α 1-antitripsina e haptoglobina nos animais que receberam a vacina oral, ressaltando a função da sílica nanoestruturada (SBA-15) como veículo de apresentação de antígeno para o sistema imune capaz de induzir uma boa resposta inflamatória.

7. Conclusão

Os leitões imunizados com vacina intramuscular contra *M. hyopneumoniae* preparada com a sílica SBA-15 apresentaram boa resposta imune humoral (IgA) e de PFAs (ceruloplasmina, α 1-antitripsina, haptoglobina e α 1-glicoproteína ácida), e menores escores de alterações respiratórias após o desafio experimental, em comparação com a vacina comercial, e não apresentaram reações adversas locais ou sistêmicas após a administração do imunizante.

8. Referências

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 552 p.

ALARCÓN, L. V.; ALLEPUZ, A.; MATEU, E. Biosecurity in pig farms: a review. **Porcine Health Management**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 4 jan. 2021. <http://dx.doi.org/10.1186/s40813-020-00181-z>.

ALMEIDA, H. M. S.; MECHLER-DREIBI, M. L.; SONÁLIO, K.; FERRAZ, M. E. S.; STORINO, G. Y.; BARBOSA, F. O.; MAES, D.; MONTASSIER, H. J.; OLIVEIRA, L. G. Cytokine expression and *Mycoplasma hyopneumoniae* burden in the development of lung lesions in experimentally inoculated pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 244, p. 108647, maio 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108647>.

ALVES, D. A.; MATTOS, I. B.; HOLLANDA, L. M.; LANCELLOTTI, M. Use of mesoporous silica SBA-15 and SBA-16 in association of outer membrane vesicles - OMV from *Neisseria meningitidis*. **Journal of Vaccines & Vaccination**, v. 4, n. 6, p. 1-6, 2013. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7560.1000196>.

ALVES, A. E.; SOUSA, W. M. R.; FUJIMOTO, T. A. S.; MOTA, F. C. D.; DI FILIPPO, P. A. Acute phase proteins response and their clinical application in veterinary medicine. **Veterinária Notícias**, v. 26, n. 1, p. 30, 2020. <http://dx.doi.org/10.14393/vtn-v26n1-2020-53216>.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL – ABPA, 2024. **Relatório Anual**. Disponível em: https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2024/04/ABPA-Relatorio-Anual-2024_capa_frango.pdf. Acesso em: 11 jun. 2024.

BETLACH, A. M.; FANO, E.; VANDERWAAL, K.; PIETERS, M. Effect of multiple vaccinations on transmission and degree of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in gilts. **Vaccine**, v. 39, n. 4, p. 767-774, jan. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.10.096>.

BRANDALISE, L.; TAKEUTI, K. L.; KICH, J. D.; CLAVIJO, M. J.; SIMÃO, G. M. R.; SATO, J. P. H.; COLDEBELLA, A.; PIGOZZO, R.; NAGAE, R.; DEZEN, D. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection dynamics in naïve replacement gilts introduced to positive farms. **Veterinary Microbiology**, v. 286, p. 1-7, nov. 2023. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2023.109886>.

CARVALHO, L. V.; RUIZ, R. C.; SCARAMUZZI, K.; MARENGO, E. B.; MATOS, J. R.; TAMBOURGI, D. V.; FANTINI, M. C. A.; SANT'ANNA, O. A. Immunological parameters related to the adjuvant effect of the ordered mesoporous silica SBA-15. **Vaccine**, v. 28, n. 50, p. 7829-7836, nov. 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.09.087>.

CERÓN, J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 2, p. 85-99, mar. 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2005.tb00019.x>

CERÓN, J. J.; TECLES, F.; ESCRIBANO, D.; FUENTES-PARDO, P.; MARTÍNEZ-SUBIEL, S. **Proteínas de fase aguda en el ganado porcino: de la teoría a la práctica**. 2016. Disponível em: <https://www.ivis.org/library/suis/proteínas-de-fase-aguda-suis-nº127-mayo-2016/proteínas-de-fase-aguda-en-el-ganado-porcino-de-la-teoría-a-la-práctica>. Acesso em: 31 out. 2024.

CHARERNTANTANAKUL, W. Adjuvants for swine vaccines: mechanisms of actions and adjuvant effects. **Vaccine**, v. 38, n. 43, p. 6659-6681, out. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.08.054>.

CHEONG, Y.; OH, C.; LEE, K.; CHO, K.-H. Survey of porcine respiratory disease complex-associated pathogens among commercial pig farms in Korea via oral fluid method. **Journal of Veterinary Science**, v. 18, n. 3, p. 283-289, 2017. <http://dx.doi.org/10.4142/jvs.2017.18.3.283>.

CHIA, M.-Y.; HU, A. Y.-C.; TSENG, Y.-F.; WENG, T.-C.; LAI, C.-C.; LIN, J.-Y.; CHEN, P.-L.; WANG, Y.-F.; CHAO, S.-R.; CHANG, J.-Y.; HWANG, Y.-S.; YEH, C.-T.; YU, C.-P.; CHEN, Y.-C.; SU, I.-J.; LEE, M.-S. Evaluation of MDCK cell-derived influenza H7N9 vaccine candidates in ferrets. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. 1-13, 23 mar. 2015. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0120793>.

CLAVIJO, M. J.; HU, D.; KRANTZ, S.; CANO, J. P.; MARÓSTICA, T. P.; HENAO-DIAZ, A.; SILVA, A. P. S. P.; HEMKER, D.; TAPIA, E.; ZIMMERMAN, S.; FANO, E.; POLSON, D.; FITZGERALD, R.; TUCKER, A.; MAIN, R.; WANG, C.; ZIMMERMAN, J. J.; ROTOLO, M. L. *Mycoplasma hyopneumoniae* surveillance in pig populations: establishing sampling guidelines for detection in growing pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1-13, 20 abr. 2021. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.03051-20>.

CONTIN, C. M.; COELHO, S. B.; OLIVEIRA, J. R.; OLIVIO, M. B.; VIEIRA, M. R.; BAGLIOTTI, C. M. F.; CRIVELLENTI, L. Z.; BORIN-CRIVELLENTI, S.; SANTANA, A. E. Proteínas de fase aguda: revisão literária. **Investigação: Medicina Veterinária**, v. 14, n. 2, p. 73-76, 2015. <http://dx.doi.org/10.26843/investigacao.v14i2.869>.

DEMATTÊ FILHO, L. C.; PEREIRA, D. C. O.; PEREIRA, G. V. Produção e mercado de suínos com atributos de qualidade diferenciada - Criação de cadeias de valor. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 2, n. 5, p. 1624-1641, set. 2019.

ECKERSALL, P. D.; BELL, R. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v. 185, n. 1, p. 23-27, jul. 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.04.009>.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária: a arte do diagnóstico**. 4. ed. São Paulo: Roca, 2020. 704 p.

FERRAZ, M. E. S.; ALMEIDA, H. M. S.; STORINO, G. Y.; SONÁLIO, K.; SOUZA, M. R.; MOURA, C. A. A.; COSTA, W. M. T.; LUNARDI, L.; LINHARES, D. C. L.; OLIVEIRA, L. G. Lung consolidation caused by *Mycoplasma hyopneumoniae* has a negative effect on productive performance and economic revenue in finishing pigs. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 182, p. 105091, set. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105091>.

FERREIRA, G. C.; SANCHES, T. V. C.; MECHLER-DREIBI, M. L.; ALMEIDA, H. M. S.; STORINO, G. Y.; SONALIO, K.; PETRI, F. A. M.; MARTINS, T. S.; SILVA, L. C. C.; MONTASSIER, H. J.; SANT'ANNA, O. A.; FANTINI, M. C. A.; OLIVEIRA, L. G. Efficacy evaluation of a novel oral silica-based vaccine in inducing mucosal immunity against *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Research in Veterinary Science**, v. 158, p. 141-150, 2023. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2023.03.018>.

GÓMEZ-LAGUNA, J.; SALGUERO, F. J.; PALLARÉS, F. J.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, I. M.; BARRANCO, I.; CARRASCO, L. Acute Phase Proteins as Biomarkers in Animal Health and Welfare. In: VEAS, F. (Ed.). **Acute Phase Proteins as Early Non-Specific Biomarkers of Human and Veterinary Diseases**. Londres: Intechopen, 2011. Cap. 12. p. 259-298.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M. J. M.; NIEWOLD, T. A.; KOOPMANS, S. J. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University-Science B**, v. 6, n. 11, p. 1045-1056, 2005. <http://dx.doi.org/10.1631/jzus.2005.b1045>.

HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F.; CHIERS, K.; MAES, D.; DUCATELLE, R.; DECOSTERE, A. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? **Veterinary Microbiology**, v. 100, n. 3-4, p. 255-268, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.03.002>.

HALBUR, P. G.; PAUL, P. S.; MENG, X.-J.; LUM, M. A.; ANDREWS, J. J.; RATHJE, J. A. Comparative pathogenicity of nine us porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a five-week-old cesarean-derived,

colostrum-deprived pig model. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, n. 1, p. 11-20, jan. 1996. <http://dx.doi.org/10.1177/104063879600800103>.

HEEGAARD, P. M. H.; STOCKMARR, A.; PIÑEIRO, M.; CARPINTERO, R.; LAMPREAVE, F.; CAMPBELL, F. M.; ECKERSALL, P.; TOUSSAINT, M. J. M.; GRUYS, E.; SORENSEN, N. Optimal combinations of acute phase proteins for detecting infectious disease in pigs. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 50, 2011. <http://dx.doi.org/10.1186/1297-9716-42-50>.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. San Diego: Academic, 2008. 916 p.

KHALIL, R.; AL-HUMADI, N. Types of acute phase reactants and their importance in vaccination (Review). **Biomedical Reports**, v. 12, n. 1, p. 143-152, 2019. <http://dx.doi.org/10.3892/br.2020.1276>.

LABER, K. E.; WHARY, M. T.; BINGEL, S. A.; GOODRICH, J. A.; SMITH, A. C.; SWINDLE, M. M. Biology and Diseases of Swine. In: FOX, J. G.; ANDERSON, L. C.; LOEW, F. M.; QUIMBY, F. W. **Laboratory Animal Medicine**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2002. Cap. 15. p. 615-673.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, ago. 1970. <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>.

MAES, D.; BOYEN, F.; DEVRIENDT, B.; KUHNERT, P.; SUMMERFIELD, A.; HAESEBROUCK, F. Perspectives for improvement of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccines in pigs. **Veterinary Research**, v. 52, n. 1, p. 1-20, 8 maio 2021. <http://dx.doi.org/10.1186/s13567-021-00941-x>.

MAES, D.; SIBILA, M.; KUHNERT, P.; SEGALÉS, J.; HAESEBROUCK, F.; PIETERS, M. Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs:

knowledge gaps for improved disease control. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, p. 110-124, 23 ago. 2017. <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12677>.

MAES, D.; SIBILA, M.; PIETERS, M. **Mycoplasmas in Swine**. Benelux: ACCO, 2020. 345 p.

MECHLER-DREIBI, M. L.; ALMEIDA, H. M. S.; SONALIO, K.; MARTINES, M. A. C.; PETRI, F. A. M.; ZAMBOTTI, B. B.; FERREIRA, M. M.; STORINO, G. Y.; MARTINS, T. S.; MONTASSIER, H. J.; SANT'ANNA, O. A.; FANTINI, M. A. C.; OLIVEIRA, L. G. Oral vaccination of piglets against *Mycoplasma hyopneumoniae* using silica SBA-15 as an adjuvant effectively reduced consolidation lung lesions at slaughter. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 17 nov. 2021. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-01883-2>.

MILLER, I.; GIANAZZA, E. Proteomic methods for the study of porcine acute phase proteins – anything new to detect? **Veterinary Research Communications**, v. 47, n. 4, p. 1801-1815, 15 jul. 2023. <http://dx.doi.org/10.1007/s11259-023-10170-6>.

MORRIS, C. R.; GARDNER, I. A.; HIETALA, S. K.; CARPENTER, T. E.; ANDERSON, R. J.; PARKER, K. M. Seroepidemiologic study of natural transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 21, n. 4, p. 323-337, jan. 1995. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-5877\(94\)00384-u](http://dx.doi.org/10.1016/0167-5877(94)00384-u).

MOTA, E. F.; LIMA, M. G. S.; MELO, D. F. Adjuvantes imunológicos: avanços e perspectivas (Immunological adjuvants: recente advances and perspectives). **Ciência Animal**, v. 16, n. 2, p. 79-88, 2006.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, v. 168, n. 1, p. 28-40, jul. 2004. [http://dx.doi.org/10.1016/s1090-0233\(03\)00119-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1090-0233(03)00119-9).

OLIVEIRA, C. L. P.; LOPES, J. L. S.; SANT'ANNA, O. A.; BOTOSSO, V. F.; BORDALLO, H. N.; FANTINI, M. C. A. The development of new oral vaccines using porous silica. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 34, n. 26, p. 264001, 2022. <http://dx.doi.org/10.1088/1361-648x/ac6559>.

PARRA, M. D.; FUENTES, P.; TECLES, F.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; MARTÍNEZ, J. S.; MUÑOZ, A.; CERÓN, J. J. Porcine acute phase protein concentrations in different diseases in field conditions. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 53, n. 10, p. 488-493, 2006. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0450.2006.01002.x>.

PEREZ, L. Acute phase protein response to viral infection and vaccination. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 671, p. 196-202, ago. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2019.07.013>.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v. 35, n. 2, p. 163-187, mar. 2004. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2004002>.

PIETERS, M. G.; MAES, D. Mycoplasmosis. In: ZIMMERMAN, J. J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G. W.; ZHANG, J. (Eds.). **Diseases of Swine**. Hoboken: Wiley Blackwell, 2019. p. 863–883.

POVEDA, J. B.; RAMÍREZ, A. S.; DE LA FE, C.; ASSUNCÁU, P.; DÍAZ-BERTRANA, L. Mycoplasmas. In: VADILLO, S.; PÍRIZ, S.; MATEOS, E. (Eds.). **Manual de Microbiología Veterinaria**. Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 2002. p. 423-430.

POWANDA, M. C.; MOYER, E. D. A brief, highly selective history of acute phase proteins as indicators of infection, inflammation and injury. **Inflammopharmacology**, v. 29, n. 3, p. 897-901, 21 maio 2021. <http://dx.doi.org/10.1007/s10787-021-00820-z>.

PULENDRAN, B.; ARUNACHALAM, P. S.; O'HAGAN, D. T. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 6, p. 454-475, 6 abr. 2021. <http://dx.doi.org/10.1038/s41573-021-00163-y>.

RAMIREZ, A.; KARRIKER, L. A. Herd Evaluation. In: ZIMMERMAN, J. J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G. W. (Eds.). **Diseases of Swine**. 10. ed. Ames: Iowa State University Press, 2012. p. 5-17.

RASMUSSEN, M. K.; KARDJILOV, N.; OLIVEIRA, C. L. P.; WATTS, B.; VILLANOVA, J.; BOTOSSO, V. F.; SANT'ANNA, O. A.; FANTINI, M. C. A.; BORDALLO, H.N. 3D visualisation of hepatitis B vaccine in the oral delivery vehicle SBA-15. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 15 abr. 2019. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-42645-5>.

RAZIN, S. The genus *Mycoplasma* and related genera (class *Mollicutes*). **The Prokaryotes**, p. 836-904, 2006. http://dx.doi.org/10.1007/0-387-30744-3_29.

REAGAN, W. J.; SHOIEB, A. M.; SCHOMAKER, S. J.; MARKIEWICZ, V. R.; CLARKE, D. W.; SELLERS, R. S. Evaluation of rat acute phase proteins as inflammatory biomarkers for vaccine nonclinical safety studies. **Toxicologic Pathology**, v. 48, n. 7, p. 845-856, 2020. <http://dx.doi.org/10.1177/0192623320957281>.

RECH, R.; GAVA, D.; SILVA, M. C.; FERNANDES, L. T.; HAACH, V.; CIACCIZANELLA, R.; SCHAEFER, R. Porcine respiratory disease complex after the introduction of H1N1/2009 influenza virus in Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 65, n. 1, p. 155-161, 14 nov. 2017. <http://dx.doi.org/10.1111/zph.12424>.

SACO, Y.; BASSOLS, A. Acute phase proteins in cattle and swine: a review. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 52, suppl. 1, p. 50-63, fev. 2023. <http://dx.doi.org/10.1111/vcp.13220>.

SCARAMUZZI, K.; OLIVEIRA, D. C. A.; CARVALHO, L. V.; TAMBOURGI, D. V.; TENÓRIO, E. C. N.; RIZZI, M.; MUSSALEM, J.; FANTINI, M. C. A.; BOTOSSO, V. F.; SANT'ANNA, O. A. Nanostructured SBA-15 silica as an adjuvant in immunizations with hepatitis B vaccine. **Einstein (São Paulo)**, v. 9, n. 4, p. 436-441, dez. 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/s1679-45082011ao2162>.

STORINO, G. Y.; PETRI, F. A. M.; MECHLER-DREIBI, M. L.; AGUIAR, G. A.; TOLEDO, L. T.; ARRUDA, L. P.; MALCHER, C. S.; MARTINS, T. S.; MONTASSIER, H. J.; SANT'ANNA, O. A.; FANTINI, M. C. A.; OLIVEIRA, L. G. Use of nanostructured silica SBA-15 as an oral vaccine adjuvant to control *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine production. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 7, p. 6591, 1 abr. 2023. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24076591>.

SUH, J.; OH, T.; CHAE, C. An evaluation of intradermal all-in-one vaccine based on an inactivated recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* strain expressing porcine circovirus type 2 (PCV2) capsid protein against Korean stains of PCV2d and *M. hyopneumoniae* challenge. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 90-91, p. 101911, 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2022.101911>.

TAKEUTI, K. L.; BARCELLOS, D. E. S. N.; LARA, A. C.; KUNRATH, C. F.; PIETERS, M. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in naturally infected gilts over time. **Veterinary Microbiology**, v. 203, p. 215-220, maio 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.03.025>.

TAKEUTI, K. L.; SANTOS, L. F. Micoplasmoses. In: BARCELLOS, D.; GUEDES, R. M. C. (Eds.). **Doenças dos Suínos**. Porto Alegre: Ed. dos Autores, 2022. p. 256-275.

TAO, Y; SHU, J.; CHEN, J.; WU, Y.; HE, Y. A concise review of vaccines against *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Research in Veterinary Science**, v. 123, p. 144-152, abr. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.007>.

THACKER, E. L. Mycoplasmal Diseases. In: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. (Eds.). **Diseases of Swine**. 9. ed. Ames: Blackwell, 2006. Cap. 42. p. 701-718.

THACKER, E. L.; MINION, F. C. Mycoplasmosis. In: ZIMMERMAN, J. J. (Ed.). **Diseases of Swine**. Ames: Iowa State University Press, 2010. p. 779–797.

THAKOR, J. C.; SAHOO, M.; SINGH, K. P.; SINGH, R.; QURESHI, S.; KUMAR, A.; KUMAR, P.; PATEL, S.; SINGH, R.; SAHOO, N. R. Porcine respiratory disease complex (PRDC) in Indian pigs: a slaughterhouse survey. **Veterinaria Italiana**, v. 59, n. 1, p. 23-38, 31 mar. 2023. <http://dx.doi.org/10.12834/VetIt.2935.20591.2>.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 551 p.

TREZENA, A. G.; OSELIERO FILHO, P. L.; SILVA, L. C. C.; OLIVEIRA, C. L. P.; LOPES, J. L. S.; ANTONIO, N. S.; DETTMANN, V. F. B.; AKAMATSU, M. A.; MARTINS, T. S.; RIBEIRO, O. G.; FANTINI, M. C. A.; SANT'ANNA, O. A.; TINO-DE-FRANCO, M. Adjuvant effect of mesoporous silica SBA-15 on anti-diphtheria and anti-tetanus humoral immune response. **Biologicals**, v. 80, p. 18-26, 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2022.10.001>.

UM, H.; YANG, S.; OH, T.; CHO, H.; PARK, K. H.; SUH, J.; CHAE, C. A field efficacy trial of a trivalent vaccine containing porcine circovirus type 2a and 2b, and *Mycoplasma hyopneumoniae* in three herds. **Veterinary Medicine and Science**, v. 8, n. 2, p. 578-590, 2021. <http://dx.doi.org/10.1002/vms3.657>.

VIRGINIO, V. G.; BANDEIRA, N. C.; LEAL, F. M. A.; LANCELLOTTI, M.; ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. Assessment of the adjuvant activity of mesoporous silica nanoparticles in recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen vaccines. **Heliyon**, v. 3, n. 1, p. 1-16, jan. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00225>.

WILSON-WELDER, J. H.; TORRES, M. P.; KIPPER, M. J.; MALLAPRAGADA, S. K.; WANNEMUEHLER, M. J.; NARASIMHAN, B. Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 4, p. 1278-1316, 2009. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.21523>.

YANG, S.; AHN, Y.; OH, T.; CHO, H.; PARK, K.H.; CHAE, C. Field evaluation of a sing-dose bivalent vaccine of porcine circovirus type 2b and *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Medicine and Science**, v. 7, n. 3, p. 755-765, 2021. <http://dx.doi.org/10.1002/vms3.420>.