

IMUNOGENICIDADE DE UMA VACINA DE APLICAÇÃO INTRAVAGINAL, CONTENDO RLtB CONTRA O ALFAHERPES BOVINO TIPO-5

MATHEUS IURI FRUHAUF¹; CRISTINA MENDES PETER², NADÁLIN YANDRA
BOTTON², LARIANE DA SILVA BARCELOS², LEONARDO CLASEN RIBEIRO²;
GEFERSON FISCHER³

¹Universidade Federal de Pelotas – matheus.fruhauf@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas – cristina_peter@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - nadalinyb@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - larianebarcelos@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - leo_clasen92@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – geferson.fischer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As superfícies mucosas possuem grande importância na patogenia das enfermidades causadas pelos herpesvírus bovinos tipo 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5), que são responsáveis por prejuízos econômicos na bovinocultura mundial. A infecção e a disseminação dos herpesvírus bovinos normalmente ocorrem através das cavidades revestidas por células epiteliais de mucosa (ENGELS et al. 1996). Com isso, a estimulação do sistema imune de mucosa, através do uso de vacinas, é primordial no combate às infecções (CERUTTI, 2008).

Devido similaridade antigênica entre BoHV-1 e 5, acredita-se que ocorra proteção cruzada entre estes vírus (ZAJAC et al., 2016). Porém, alguns estudos descrevem falhas na proteção de animais desafiados com vírus não homólogo (SILVA et al., 2006).

A subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) é uma potente molécula sinalizadora, capaz de modular a resposta do sistema imunológico. Sua ação como adjuvante da imunidade de mucosa está consolidada entre os pesquisadores (SIMMONS et al., 2001; YAMANAKA et al., 2006). No entanto, não há relatos na literatura científica a respeito da avaliação da capacidade adjuvante da LTB quando co-administrada a antígenos inativados por via intravaginal.

Considerando-se a importância das vias mucosas nasal e vaginal na epidemiologia dos alphaherpesvírus bovinos, torna-se evidenciado o interesse no desenvolvimento de vacinas que propiciem imunidade de mucosa contra estes agentes infecciosos. A finalidade deste estudo foi avaliar a imunogenicidade de uma vacina inativada contra o BoHV-5, quando aplicada por via intravaginal em bovinos, associada à LTB recombinante (rLTB).

2. METODOLOGIA

Foram utilizados 30 bovinos Jersey, fêmeas, com idade entre um e dois anos, sorologicamente negativos para o BoHV-5, divididos em cinco grupos experimentais de seis animais. Os bovinos, disponibilizados pela EMBRAPA-Clima Temperado, permaneceram em pastagem de campo nativo. Cada animal foi inoculado duas vezes por via intravaginal, com intervalo de vinte e um dias, com óvulos de volume de 5 mL, compostos por 3 mL de gelatina e 2 mL de placebo ou antígeno e adjuvante (proporção 60:40 – v.v.).

O experimento contou com três grupos controles: Placebo (PL: óvulos constituídos por gelatina + E-MEM), Antígeno (AG: gelatina + BoHV-5+ E-MEM),

Adjuvante (rLTB:gelatina + 100 µg/dose de rLTB + E-MEM). Além disso, dois grupos foram inoculados com diferentes concentrações de rLTB: 50 µg/dose (rLTB50: gelatina + BoHV-5 + rLTB + E-MEM) e 100 µg/dose (rLTB100: gelatina + BoHV-5 + rLTB). A massa antigênica em todos os tratamentos em que o BoHV-5 foi utilizado foi equivalente a 2×10^7 TCID_{50/25} por dose.

O antígeno vacinal foi proveniente de uma amostra selvagem de BoHV-5, cepa RP, isolada e caracterizada pelo Laboratório de Virologia e Imunologia, da Faculdade de Veterinária da UFPeL (FISCHER, et al. 2010).

A rLTB foi obtida conforme metodologia conhecida (CONCEIÇÃO et al. 2010).

A formulação dos óvulos vaginais, conforme descrito acima, foi realizada utilizando metodologia descrita por (Ansel et al. 2000), a base de gelatina farmacêutica (Gelatina®, Sigma). Estes foram vertidos em moldes plásticos de 5mL em formato de projétil.

Para mensuração da resposta imune humoral, foram coletadas amostras de sangue, muco nasal e vaginal nos dias 0, 21 e 42 após a primeira inoculação. Após a sua obtenção. A detecção de anticorpos contra o BoHV-5 no soro e muco das cavidades nasal e vaginal foi realizada através de um ELISA indireto (DO₄₅₀). A titulação dos níveis sanguíneos de anticorpos totais, foi realizada através da técnica de soroneutralização, a partir das amostras de soro e muco nasal e vaginal. Ambas técnicas seguindo metodologia conhecida (FISCHER et al. 2010).

Para comparação dos títulos de anticorpos obtidos nos testes de ELISA e soroneutralização, foi utilizado a Análise de variância (ANOVA). O teste LSD (ELISA) foi utilizado para determinar diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as médias dos tratamentos. Todos os dados foram expressos pela média \pm desvio padrão médio (SEM). O software utilizado foi o Statistix 9.0®.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa), da Universidade Federal de Pelotas – UFPeL (CEEa 0291).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

FIGURA 1 (A) E (B) – NÍVEIS VAGINAIS DE IGA (A) E IGG (B) MENSURADOS POR ELISA INDIRETO

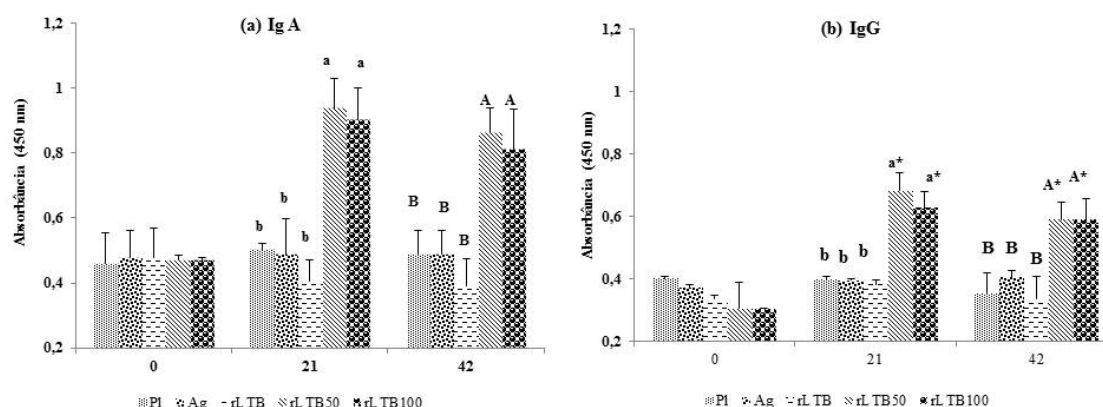


Fig. 1. (Placebo: (PL) – óvulos constituídos por gelatina + E-MEM), Antígeno (AG: gelatina + BoHV-5 + E-MEM), Adjuvante (rLTB: gelatina + 100 µg/dose de rLTB + E-MEM), rLTB50 (gelatina + BoHV-5 + 50 µg rLTB + E-MEM), rLTB100 (gelatina + BoHV-5 + 100 µg rLTB), 0, 21, 42 após a primeira inoculação. Dados expressos pela média \pm desvio padrão médio (SEM). (a, b, A, B) Letras distintas diferem entre os grupos;

Como pode ser observado na Figura 1, a inoculação intravaginal em bovinos de uma vacina inativada contra o BoHV-5 estimulou a produção tanto de IgA com IgG na mucosa vaginal. Níveis estatisticamente superiores ($p < 0,05$) de IgA (Figura

1a) e IgG (Figura 1b) foram observados tanto aos 21 como aos 42 dias após a primeira inoculação nos tratamentos em que o antígeno foi associado à rLTB, em relação aos grupos controle. Sabe-se que a resposta imune de mucosa é induzida de maneira mais eficiente quando a inoculação ocorre nas próprias mucosas, enquanto vias sistêmicas geralmente induzem uma fraca resposta imune nestas superfícies (NEUTRA et al., 2006). No atual trabalho, a vacina inativada contra o BoHV-5 utilizando a LTB como adjuvante, de aplicação intravaginal, induziu uma resposta imune humoral, tanto local quanto sistêmica, detectada pela técnica de ELISA indireto.

TABELA 1 TÍTULOS DE ANTICORPOS MENSURADOS POR
SORONEUTRALIZAÇÃO

	SORO			CV		
	1 ^a Coleta	2 ^a Coleta	3 ^a Coleta	1 ^a Coleta	2 ^a Coleta	3 ^a Coleta
T1	0	0	0	0	0	0
T2	0	0	0	0	0	0
T3	0	0	0	0	0	0
T4	0	2,86	7,53	0	0,291	1,501
T5	0	3,9	15,7	0	0,36	2,368

Tabela 1. T1 - Placebo (gelatina) + MEM, T2 - Gelatina + Ag, T3 - Gelatina + rLTB (100 µg/dose), T4 - Ag + gelatina + 50 µg/dose rLTB, T5 - Ag + gelatina + 100 µg/dose rLTB.
CV – Coeficiente de variação

Foram detectados títulos de anticorpos neutralizantes contra o BoHV-5, através da técnica de soroneutralização, após a segunda coleta (Tabela 1). Não foram detectados títulos de anticorpos nos tratamentos controle (PI, Ag e rLTB), conforme o esperado. A aplicação da vacina intravaginal com 50 µg/dose de rLTB propiciou título de anticorpos (Log₂) detectáveis na mucosa vaginal e no soro, enquanto com a inclusão de 100 µg/dose de rLTB, a resposta humoral pode ser detectada na mucosa vaginal, soro e ainda também na mucosa nasal. A vacina testada, induziu uma resposta imune humoral, tanto local quanto sistêmica, detectada pela técnica de ELISA indireto e pela soroneutralização. Nesse sentido, nossos resultados corroboram com Bergquist et al. 1997 que observaram aumento nos níveis de IgA e IgG na secreção vaginal de mulheres imunizadas por via nasal com a subunidade B da toxina colérica (CTB), o que ratifica a relação entre a resposta imune nestas mucosas.

Vacinas que utilizam a via mucosa de inoculação vem sendo estudadas principalmente contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e resultando, predominantemente, em incremento de anticorpos específicos na mucosa local. Porém, na maioria dos casos, não há incremento da resposta local para nível sistêmico (PARR et al., 1999). Por outro lado, Gallichan et al. 1995 avaliaram em camundongas inoculadas com uma vacina viva atenuada contra Herpes simplex vírus tipo 2 (HSV-2), por via intravaginal, um aumento do número de plasmócitos secretores de IgG na vagina e aumento de IgG específica tanto na secreção vaginal como no soro. Os nossos estudos, avaliando uma vacina inativada contra o BoHV-5 utilizando a LTB como adjuvante, apresentaram aumento da resposta imune humoral, tanto local quanto sistêmica. Enfatiza-se a necessidade de novos estudos, visando compreender de forma mais clara os mecanismos envolvidos na geração da resposta imune de mucosa, proporcionada por uma vacina de aplicação

intravaginal, bem como avaliar a capacidade de proteção de vacinas administradas por esta via.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a eficácia da vacina inativada contra o BoHV-5 de aplicação intravaginal associada à rLTB, uma vez que houve incremento dos níveis de anticorpos IgA e IgG, nas mucosas vaginal e nasal e ainda dos níveis séricos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSEL, H. C, Popovich, N.G, Allen J.V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistema de liberação de fármacos**. São Paulo: Premier, 2000. 6ª Ed.

ANZILIERO, D.; SANTOS, C. M. B.; BRUM, M. C. S.; WEIBLEN, R.; CHOWDHURY, S.I.; FLORES, E. F. A recombinant bovine herpesvirus 5 defective in thymidine kinase and glycoprotein E is immunogenic for calves and confers protection upon homologous challenge and BoHV-1 challenge. **Veterinary microbiology**, Reino Unido, v. 154, n. 1-2, p. 14-22, 2011.

CERUTTI, A. The regulation of IgA class switching. **Nature reviews immunology**, v. 8, n. 6, p. 421, 2008.

CONCEIÇÃO, F.R.; MOREIRA, A.N.; DELLAGOSTIN, O.A. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of Mycoplasma hyopneumoniae P97 adhesin with Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. **Vaccine**, Países Baixos. v. 24, n. 29-30, p. 5734-5743, 2006.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary microbiology**, Reino Unido, v. 53, n. 1-2, p. 3-15, 1996.

HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nature medicine**, v. 11, n. 4s, p. S45, 2005.

FISCHER, G.; CONCEIÇÃO, F.R.; LEITE, F.P.L.; MORAES, C.M.; FERREIRA, L.N.; VILELA, C.O.; CAETANO, C. F.; VARGAS, G.D.; HÜBNER, S.O.; VIDOR, T.; ROEHE, P.M. Recombinant Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit humoral adjuvant effect depends on dose and administration route. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Suíça. v. 26, n. 3, p. 489-495, 2010.

SILVA, A.D.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; ESTEVES, P.A.; HÜBNER, S.O.; DRIEMEIER, D.; OLIVEIRA, A.P.; RIJSEWIJK, F.; ROEHE, P.M. Vaccination with a gE-negative bovine herpesvirus type 1 vaccine confers insuficiente protection to a bovine herpesvirus type 5 challenge. **Vaccine**, Países Baixos. v. 24, n. 16, p. 3313-3320, 2006.

ZAJAC, M. P.; PUNTEL M.; ZAMORANO, P.I.; SADIR, A. M.; ROMERA, S. A. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. **Research in veterinary science**. v. 81, n. 3, p. 327-334, 2006.