

DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA RECOMBINANTE CONTRA O ROTAVÍRUS EQUINO

GIOVANNA HELENA DA SILVA THIER¹; VITÓRIA MÜLLER²; FÁBIO LEIVAS LEITE³; NEIDA LUCIA CONRAD⁴; BRUNA DA ROSA CURCIO⁵; CARLOS EDUARDO WAYNE NOGUEIRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – ghsthier@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - mullervitoria@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – conradneida@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – curciobruna@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas - cewnogueira@gmail.com

1. DESCRIÇÃO DA INOVAÇÃO

Os rotavírus são vírus RNA fita dupla que pertencem ao gênero Rotavírus, são não envelopados e possuem formato estrutural icosaédrico (NEWMAN et al., 1975). Estes agentes virais são responsáveis por causar gastroenterite aguda em diversas espécies de mamíferos, incluindo humanos, bovinos, suínos e equinos, entre outras espécies. A infecção por rotavírus é a principal causa de diarreia em potros, e se caracteriza principalmente pela má absorção, devido à destruição dos enterócitos presentes no ápice das vilosidades intestinais (BAILEY et al., 2013). Como consequência, potros infectados podem apresentar apatia, anorexia, febre e, frequentemente, quadros graves de desidratação e desequilíbrio eletrolítico, condições que podem ser fatais se não houver intervenção adequada (FREDERICK et al., 2009). O sequenciamento do genoma de rotavírus isolados das fezes de equinos propõe que o G3P[12] e o G14P[12] são os principais genótipos que infectam equinos (BAILEY et al., 2013). Além disso, um estudo que investigou a distribuição global dos rotavírus que infectam equinos demonstrou que 99% das cepas identificadas em potros são G3P[12] ou G14P[12], enquanto que os demais rotavírus identificados foram considerados casos raros de transmissão cruzada entre espécies (PAPP et al., 2013).

A elevada eliminação viral pelas fezes dos potros, aliada à resistência e persistência do vírus no ambiente, favorece a alta transmissibilidade e elevada morbidade na espécie equina, o que reforça a necessidade de estratégias eficazes de controle. A principal medida profilática é a vacinação das éguas gestantes no terço final da gestação, a fim de imunizar os potros através da transferência passiva de anticorpos vacinais (MAGDESIAN, 2005). Contudo, no Brasil não existem vacinas comerciais disponíveis para equinos.

Para o desenvolvimento de uma vacina recombinante contra os principais rotavírus que infectam equinos, realizou-se o desenho *in silico* de uma quimera recombinante. Inicialmente, foi realizado o alinhamento das sequências de nucleotídeos que codificam as proteínas virais VP6, VP7 e NSP4 de rotavírus G3P[12] e G14P[12] de diferentes isolados. Posteriormente, foram selecionados dez epítomos com predileção para MHCII (complexo principal de histocompatibilidade classe II) e BCR (receptor de células B) para compor o gene sintético, que foi denominado de Rota10. Estas proteínas desempenham papéis fundamentais na estrutura e patogenicidade do vírus. A proteína VP6 constitui a camada intermediária do capsídeo viral, sendo altamente conservada e capaz de

induzir respostas imunes celulares e humorais (ESTES & GREENBERG, 2013). A VP7 é uma glicoproteína da camada externa do vírus que contém epítomos neutralizantes, essenciais para a indução de anticorpos capazes de bloquear a infecção viral (SETTEMBRE et al., 2011). Por sua vez, a NSP4 é uma proteína não estrutural que funciona como enterotoxina viral, modulando a resposta imunológica do hospedeiro (HU et al., 2012). A combinação dessas três proteínas na formulação da vacina visa promover uma proteção mais ampla e eficaz, estimulando múltiplos mecanismos de defesa contra os principais rotavírus que infectam equinos.

2. ANÁLISE DE MERCADO

Apesar de a infecção por rotavírus ser reconhecida como a principal causa de diarreia em potros, atualmente existem apenas três vacinas comerciais disponíveis no mercado mundial, produzidas nos Estados Unidos, Japão e Argentina. Todas são compostas por vírus inativados do genótipo G3P[12] e, portanto, não incluem antígenos do genótipo G14P[12], cuja circulação tem se tornado cada vez mais frequente em populações de equinos ao redor do mundo (CAROSSINO et al., 2018). Diversos estudos têm demonstrado um aumento na incidência de casos de infecção por cepas G14P[12], evidenciando a limitação das vacinas atuais em promover uma proteção eficaz. (CAROSSINO et al., 2024).

No Brasil, não existem vacinas licenciadas para uso em equinos, e os criatórios enfrentam dificuldades para importar as vacinas comerciais de outros países. Esse cenário reforça a importância no desenvolvimento de uma vacina capaz de gerar imunidade heterotípica que contemple os genótipos G3P[12] e G14P[12], atualmente os principais responsáveis pelos casos de rotavirose em equinos (CAROSSINO et al., 2024).

3. ESTRATÉGIA DE DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO

Para o desenvolvimento deste produto, obteve-se um plasmídeo pET23a(+) contendo o gene sintético Rota10. Diferentes linhagens de *Escherichia coli* (Star, C41(DE3), C43, pLysS e Rosetta) foram transformadas com o vetor recombinante por choque térmico. A melhor cepa e o tempo ótimo de expressão foram determinados por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), selecionando-se a *E. coli* C41(DE3) e o tempo de expressão de 4 horas. As bactérias transformadas foram cultivadas em caldo LB (Lúria Bertani) acrescido de 0,1 mg/ml de ampicilina. Os cultivos foram mantidos a 37 °C e 180 rpm até atingirem a OD=0,6-0,8 e, então, mantidos no shaker, sob as mesmas condições, por 4 horas. Os cultivos foram centrifugados, ressuspensos em tampão de ligação, sonificados e centrifugados por 12.000 x g e 4 °C por 45 minutos. O sobrenadante foi clarificado e a proteína recombinante Rota10 foi purificada através da cromatografia de afinidade ao níquel. A proteína foi posteriormente dialisada, quantificada e caracterizada por SDS-PAGE e *Western Blot*.

A próxima etapa para o desenvolvimento e implementação desta vacina, consiste na determinação da sua imunogenicidade. Para isso, será realizado o delineamento experimental para imunização da espécie alvo. Serão incluídas no estudo 50 éguas gestantes da raça Crioula, com idades entre 5-12 anos. As éguas serão divididas em dois grupos: Grupo Controle (n=25), que não receberá a

vacina, e Grupo Vacinado (n=25), composto por éguas que receberão 400 µg do antígeno Rota10, acrescido de 10% de hidróxido de alumínio, totalizando um volume de 2 ml, que será administrado via intramuscular entre 270 e 300 dias de gestação. Posteriormente, o Grupo Vacinado receberá uma dose de reforço, 14 dias após a primeira administração. Amostras de sangue das éguas serão coletadas antes da vacinação e, posteriormente, a cada 10 dias, durante 90 dias após a primeira aplicação. Nos potros, as coletas sanguíneas ocorrerão nos dias 2, 15, 30, 45 e 60 de vida.

A resposta imune humoral será avaliada por meio de ELISA indireto, para detecção de IgG total específica contra o antígeno Rota10. A caracterização dos isotipos de IgG (IgG1, IgG4/7 e IgG3/5) será realizada por ELISA indireto, utilizando anticorpos específicos para cada subclasse. Para determinar a capacidade neutralizante dos anticorpos vacinais, será realizado o teste de neutralização viral no Laboratório de Virus Equinos - INTA Castelar (ARG), conforme descrito anteriormente por Barrandeguy et al. (1998), e utilizando cepas de rotavírus G3P[12] e G14P[12].

A resposta imune celular será avaliada por análise da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias. Para isso, serão isoladas células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) a partir de amostras de sangue total coletado das éguas (30 dias após a vacinação) e dos potros (15 dias de vida). Para posterior extração de mRNA e análise da expressão gênica por RT-PCR.

4. RESULTADOS ESPERADOS E IMPACTO

Espera-se que a vacinação de éguas com o antígeno recombinante Rota10 seja capaz de induzir uma resposta imune humoral e celular contra os rotavírus G3P[12] e G14P[12]. Além do aumento quantitativo da IgG total, espera-se uma modulação qualitativa da resposta imune, com elevação dos níveis dos diferentes subclasses de IgG, e que estes anticorpos possuam capacidade neutralizante contra os principais rotavírus que acometem equinos. No que diz respeito à transferência de imunidade passiva, espera-se que os potros nascidos de éguas vacinadas adquiram níveis superiores de IgG específico anti-Rota10, bem como das subclasses de IgG, em relação aos potros nascidos de éguas não vacinadas. Além disso, espera-se que os anticorpos adquiridos via imunidade passiva possuam capacidade neutralizante, sugerindo uma transferência não apenas quantitativamente superior, mas também qualitativamente mais eficaz, diminuindo assim a infecção, sintomatologia clínica nos potros e disseminação do rotavírus através das fezes.

Embora já existam vacinas inativadas contra o rotavírus G3P[12], estas geram imunidade de forma parcial e não estão disponíveis no mercado brasileiro. Com o desenvolvimento deste produto, esperamos disponibilizar uma vacina recombinante contra os principais rotavírus que infectam equinos, capaz de superar as limitações das vacinas atualmente disponíveis no mercado e de gerar imunidade heterotípica contra os genótipos G3P[12] e G14P[12].

5. CONCLUSÕES

Embora o rotavírus seja reconhecido como o principal agente causador de diarreia neonatal em potros, as opções de vacinas disponíveis no mercado são

escassas e apresentam importantes limitações quanto à eficácia. Nesse contexto, o desenvolvimento da vacina recombinante Rota10 surge como uma alternativa promissora para a prevenção em equinos, especialmente no cenário nacional, onde não há vacinas específicas e o acesso às formulações comerciais importadas é restrito.

Agradecimentos: Órgãos de fomentos CAPES e CNPq pela concessão de bolsas aos alunos de graduação e pós-graduação

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, K. E., et al. Equine rotaviruses - Current understanding and continuing challenges. *Veterinary Microbiology*, v. 167, n. 1–2, p. 135–144, 2013.
- BARRANDEGUY, M., et al. Prevention of rotavirus diarrhoea in foals by parenteral vaccination of the mares: field trial. *Development in Biological Standardization*, v. 92, p. 253–257, 1998.
- CAROSSINO, M. et al. Equine rotavirus infection: epidemiology, diagnosis, and vaccination strategies. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 34, n. 3, p. 441–457, 2018. DOI: 10.1016/j.cveq.2018.05.004.
- CAROSSINO, M. et al. Passive immunity transfer to foals: Challenges in the era of emerging equine rotavirus strains. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 120, 2024. DOI: 10.1016/j.jevs.2024.104123.
- ESTES, M.K. and GREENBERG, H.B. Rotaviruses. In: KNIPE, D.M., et al. *Fields Virology*, 6. Ed. Philadelphia: Wolter Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 1347–1401.
- FREDERICK, M. et al. Equine rotavirus: A major cause of foal diarrhea. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 23, n. 2, p. 441–447, 2009. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2009.0301.x.
- HU, L. et al. Rotavirus nonstructural protein 4 (NSP4) forms oligomers that function as viroporins. *Journal of Virology*, v. 86, n. 18, p. 10031–10046, 2012. DOI: 10.1128/JVI.01035-12.
- MAGDESIAN, K. G. Prevention and management of infectious diseases in neonatal foals. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 21, n. 1, p. 35–44, 2005. DOI: 10.1016/j.cveq.2004.10.002.
- MAGDESIAN, K. G. et al. Rotaviruses. In: VET-MED, R. et al. (Ed.). *Veterinary Virology*. 3. ed. Philadelphia: Elsevier, 2014. p. 101–123.
- NEMOTO, M. et al. Rotavirus infection in farm animals: epidemiology and control measures. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 83, n. 1, p. 10–17, 2021. DOI: 10.1292/jvms.20-0247.
- NEWMAN, J.F.E., et al. Characterization of a rotavirus. *Nature*, v. 258, p. 631–633, 1975.
- PAPP, H. et al. Review of group A equine rotavirus strains reported worldwide. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 165, n. 3–4, p. 190–199, 2013.
- SEPTEMBRE, E. C. et al. Atomic model of an infectious rotavirus particle. *EMBO Journal*, v. 30, n. 3, p. 408–416, 2011. DOI: 10.1038/emboj.2010.330.