

VACINA INTRAVAGINAL INATIVADA CONTRA OS ALPHAPERESVÍRUS BOVINOS ACRESCIDA DE POLÍMEROS MUCOADESIVOS

LUIZA RIBEIRO DA ROSA¹; IZADORA DUMMER WEBER²; MARINA STURBELLE GARCIA²; NADÁLIN YANDRA BOTTON²; MATHEUS IURI FRÜHAUF²; GEFERSON FISCHER³

¹Universidade Federal de Pelotas – luizaribeirovet@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas – izadoradw@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – sturbellemarina@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – nadalinyb@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – matheus.fruhauf@outlook.com

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

1. DESCRIÇÃO DA INOVAÇÃO

A vacina inativada intravaginal desenvolvida contra os Alphaherpesvírus bovinos 1 e 5 pode ser um avanço na prevenção das doenças reprodutivas e neurológicas provocadas por esses vírus, respectivamente, visto o impacto econômico que rebanhos infectados por estes agentes causam aos produtores, especialmente na América do Sul, onde há maior prevalência (ELIAS et al., 2004; FERREIRA et al., 2018).

O produto utiliza o vírus inativado, sem a possibilidade de reversão à sua forma virulenta, e incorpora o hidróxido de alumínio, que atua prolongando a exposição do antígeno e facilitando a apresentação para as APCs como adjuvante (FERREIRA, 2017). A formulação é composta, ainda, por dois polímeros mucoadesivos, a 2-Hidroxietilcelulose e o Kolliphor® P407, que além de auxiliarem na formação do dispositivo vacinal, oferecem liberação controlada e adesão prolongada do antígeno à superfície mucosa (PEREIRA, 2011).

A administração do produto ocorre mediante um dispositivo intravaginal biodegradável, e a administração localizada é realizada com o intuito de estimular a resposta imunológica (especialmente humoral, através das imunoglobulinas G e A) nas superfícies mucosas, que são a porta de entrada e também o primeiro sítio de replicação do vírus no organismo animal (ENGELS e ACKERMANN, 1996).

2. ANÁLISE DE MERCADO

O público-alvo do produto inclui principalmente empresas de produtos biotecnológicos e veterinários, profissionais de saúde animal e produtores rurais. O produto atende necessidade como segurança, eficiência e facilidade de aplicação, oferecendo uma solução segura ao evitar os riscos associados às vacinas atenuadas, como reversão do vírus à forma virulenta e/ou reações adversas em fêmeas prenhes; proporcionar uma resposta imunológica humoral nas mucosas nasal e vaginal, podendo reduzir títulos virais nessas cavidades e prevenir as doenças associadas aos agentes patogênicos em questão (FLORES, 2017); e facilidade de aplicação da vacina intravaginal quando em animais contidos, sendo uma alternativa conveniente para o manejo diário.

3. ESTRATÉGIA DE DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO

Os ensaios *in vitro* e análises laboratoriais deste estudo foram conduzidas junto ao Laboratório de Virologia e Imunologia (Labvir) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), e os ensaios *in vivo* de aplicação vacinal e coleta de material biológico, foram realizados no Centro

Agropecuário da Palma na UFPEL. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) com protocolo nº 4918-2017.

As vacinas intravaginais foram preparadas a partir de uma suspensão inativada da cepa RioPel (R.P.) de BoHV-5, advinda do biorrepositório do Labvir/UFPEL. O adjuvante Al(OH)₃ foi incorporado a suspensão viral inativada através de agitação constante, durante 24 horas. O estabilizante Kolliphor® P407 (BASF) foi hidratado na mistura (7,5%), mediante agitação magnética e após sua dissolução completa, o polímero 2-Hidroxietilcelulose (Sigma-Aldrich®) (20%) foi acrescido. A formulação foi vertida em forma de aço inoxidável em formato de projétil.

Para avaliação da eficiência vacinal, 20 fêmeas bovinas sorologicamente negativas para BoHV-1, BoHV-5 e BVDV pela técnica de soroneutralização, foram distribuídas aleatoriamente em três grupos experimentais, conforme a Tabela 1, e inoculadas com três doses vacinais, com intervalos de 21 dias, por via intravaginal e via parenteral (controles positivo e negativo). A coleta de material biológico foi realizada nos dias 0, 21, 42 e 63 do estudo. Amostras de secreção nasal e secreção vaginal foram coletadas para a avaliação da resposta imune humoral.

Tabela 1. Delineamento experimental e composição vacinal para avaliação do incremento na imunidade humoral gerada pela vacina experimental

Grupos	Tratamentos	Composição vacinal	Nº de animais
Grupo 1	Controle positivo	Al(OH) ₃ +BoHV-5	6
Grupo 2	Controle negativo	PBS	6
Grupo 3	Vacina experimental	Kolliphor® P407 + 2-Hidroxietilcelulose + Al(OH) ₃ + BoHV-5	8

Após extração das proteínas das secreções nasal e vaginal de acordo com protocolo descrito por Tochikubo et al. (1998), realizou-se o teste de ELISA indireto, segundo Fischer et al. (2007). Resumidamente, microplacas de 96 cavidades foram sensibilizadas com a glicoproteína D (gD) de BoHV-5 (concentração de 50 ng), diluída em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6. Alíquotas de secreção nasal e secreção vaginal foram diluídas em 1:32 em leite em pó desnatado 5% e adicionadas à placa, que foi incubada durante uma hora a 37 °C em estufa de CO₂. Como controle positivo utilizou-se um soro com título de anticorpos neutralizantes de 128, e como controle negativo, o soro fetal bovino (SFB) Gibco®, ambos diluídos em 1:100. Após lavagens com tampão PBS-T20, as placas foram incubadas por uma hora, sob as mesmas condições já citadas, com anticorpo anti IgG (concentração de 2mg/mL) e anti IgA (concentração de 1mg/mL) conjugados com peroxidase (Sigma-Aldrich®), diluídos 1:5000. Após cinco lavagens com PBS-T20, o substrato OPD (Sigma-Aldrich®) associado ao tampão citrato fosfato, pH 4,0, e ao peróxido de hidrogênio, foi adicionado à placa para revelar a reação. Quinze minutos depois a reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 2 M, e a absorbância (450 nm) foi mensurada em leitor de ELISA TP Reader® (Thermo Plate).

4. RESULTADOS ESPERADOS E IMPACTO

Na mucosa nasal, os estímulos na produção de IgA e IgG foram observados a partir de 21 e 42 dias, respectivamente, após a primeira inoculação. O Tratamento 3 (vacina experimental) foi superior em ambas as análises, quando

comparado aos Grupos 1 (controle positivo) e 2 (controle negativo). A Figura 1 demonstra o nível médio de IgG (Figura 1A) e IgA (Figura 1B) na mucosa nasal dos bovinos submetidos aos tratamentos experimentais.

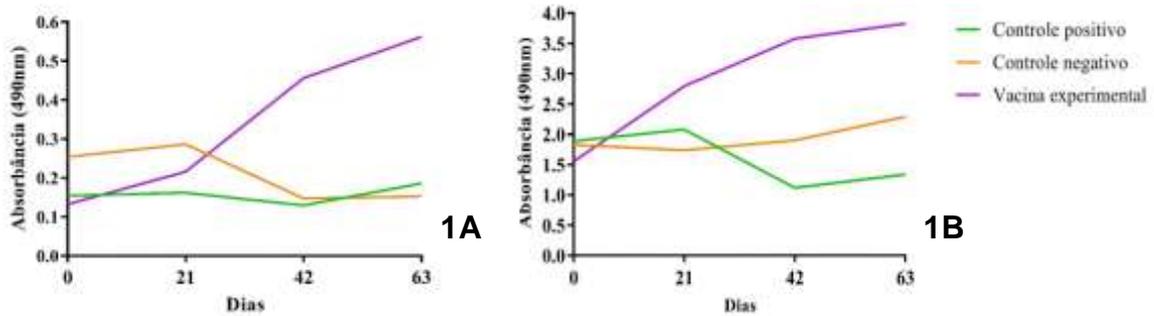


Figura 1. Níveis médios de Imunoglobulina G (IgG) (Figura 1A) e Imunoglobulina A (IgA) (Figura 1B) mensurados através de ELISA indireto na secreção nasal de bovinos imunizados.

Para os níveis médios de anticorpos na mucosa vaginal, o mesmo perfil foi observado, contudo, os animais já respondem ao tratamento aos 21 dias após a primeira inoculação. O Grupo 3 (vacina experimental) é superior quando comparado ao Grupo 2 (controle negativo) tanto em níveis de IgG quanto de IgA, mas apresenta-se igual ao Grupo 1 (controle positivo) em níveis médios de IgG após 63 dias da primeira inoculação. A Figura 2 apresenta o nível médio de IgG (Figura 2A) e IgA (Figura 2B) encontrados na mucosa vaginal dos bovinos após as imunizações.

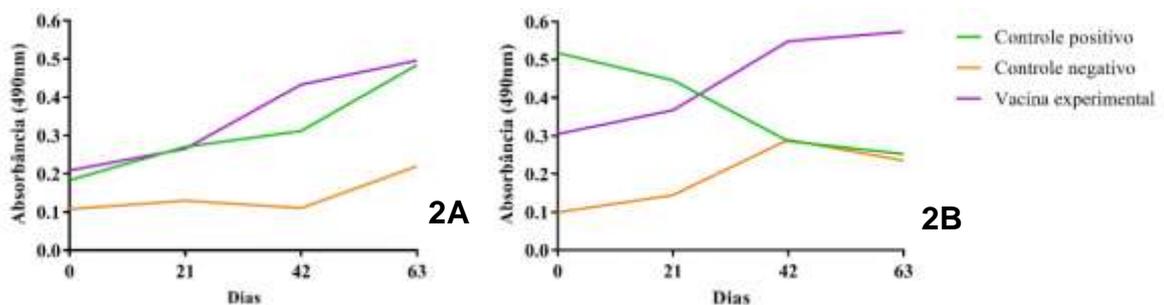


Figura 2. Níveis médios de Imunoglobulina G (IgG) (Figura 2A) e Imunoglobulina A (IgA) (Figura 2B) mensurados através de ELISA indireto na secreção vaginal de bovinos imunizados.

Neste experimento, elevadas quantidades de polímeros mucoadesivos foram inseridas na formulação, em substituição à gelatina farmacêutica, testada em um protótipo anterior. Essas concentrações elevadas podem ter impedido a liberação parcial do antígeno no meio mucoso, determinando a sua indisponibilidade e conseqüentemente não induzindo a resposta imunológica esperada no animal (especialmente formação de anticorpos neutralizantes e formação de resposta imune humoral robusta a nível de IgG e IgA), comprometendo assim, a eficácia do produto final. Atualmente, a tecnologia é tratada como um protótipo, e se encontra no nível de maturidade tecnológica TRL 4, indicando a realização de experimentos em laboratório e testes de campo, mas com necessidade de ajustes e otimizações na formulação.

Um dos principais desafios associados a este produto é o risco de eliminação da vacina pelo animal, antes que o antígeno possa ser liberado, uma vez que o dispositivo é inoculado via intravaginal. Além disso, a aplicação intravaginal limita o uso da vacina exclusivamente às fêmeas, o que pode ser uma

desvantagem em rebanhos onde a inclusão de machos é necessária para garantir uma cobertura vacinal completa e a proteção do grupo como um todo. O desenvolvimento de diferentes apresentações do produto, como pomadas, por exemplo, poderia evitar a expulsão da vacina. Uma vacina de inoculação intranasal poderia abranger a vacinação de machos.

5. CONCLUSÕES

Concluiu-se que a vacina inativada de aplicação intravaginal, utilizando como adjuvante o hidróxido de alumínio e como antígeno o BOHV-5, foi segura eficiente, visto que os animais foram capazes de produzir anticorpos IgG e IgA totais nas secreções nasais e vaginais do grupo inoculado (grupo 3) com a vacina intravaginal, sugerindo um bom desempenho dos polímeros mucoadesivos 2-Hidroxietilcelulose e Kolliphor® P407. No entanto, para sua máxima eficiência é necessário a revisão das doses destes polímeros e um novo experimento de campo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ELIAS, F.; SCHILD, A. L.; CORREA, F. Meningoencefalite e encefalomalacia por herpesvírus bovino-5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 123-131, 2004.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, 3-15, 1996.

FERREIRA, H. C. C. et al. Latent bovine herpesvirus 1 and 5 in milk from naturally infected dairy cattle. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 80, n. 11, p. 1787-1790, 2018.

FISCHER, G. et al. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**, v. 25, n. 7, p. 1250-1256, 2007.

FLORES, E. F. et al. *Virologia Veterinária*, 2 ed. Santa Maria: **Editora da UFSM**, 2017.

PEREIRA, R. R. A. Desenvolvimento e caracterização de sistema mucoadesivo termossensível contendo micropartículas de própolis para potencial tratamento de candidíase vulvovaginal. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)**, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil, 2011.

TOCHIKUBO, K. et al. A subunidade B da toxina da cólera recombinante atua como um adjuvante para as respostas da mucosa e sistêmica de camundongos à albumina de soro bovino co-administrada por via mucosa. **Vaccine**, v. 16, n. 2-3, p. 150-155, 1998.