

POTENCIAL ADJUVANTE DO GRÂNULO DE BACULOVIRUS EM VACINA INATIVADA CONTRA O ALPHAHERPESVIRUS BOVINO 5 (BoHV-5)

NADÁLIN YANDRA BOTTON¹; LARIANE DA SILVA BARCELOS²; MATHEUS IURI FRÜHAUF²; LUIZA DA ROSA RIBEIRO²; MARINA STURBELLE GARCIA² E GEFERSON FISCHER³

¹Universidade Federal de Pelotas – nadalinyb@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – larianebarcelos@gmail.com

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

²Universidade Federal de Pelotas – luizaribeirovet@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas – sturbellemarina@gmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

O Alphaherpesvirus bovino 5 (BoHV-5) pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus* e está associado com casos de meningoencefalite herpética, doença invariavelmente fatal, que acomete especialmente bovinos jovens (FLORES, 2017). Este agente infecta as células epiteliais das cavidades mucosas onde inicia a sua replicação, que é seguida pela disseminação local, neuronal, e estabelecimento da infecção latente. Esse mecanismo auxilia na perpetuação do vírus na natureza, uma vez que infecções latentes podem voltar a ser produtivas sob condições de imunossupressão para o animal, fazendo com que surtos em áreas endêmicas sejam imprevisíveis (OSTLER; JONES, 2023).

O controle desse vírus é realizado, majoritariamente, através da utilização de vacinas inativadas (FLORES, 2017). No entanto, pela incapacidade de replicação do agente, essas vacinas necessitam de associação com substâncias capazes de estimular a formação de uma resposta imunológica robusta (SHI et al., 2019). Embora várias substâncias venham sendo avaliadas quanto a sua capacidade adjuvante, a produção de vacinas inativadas continua atrelada à utilização dos sais de alumínio, que favorecem o estabelecimento da resposta imunológica humoral em detrimento da combinação entre os mecanismos humorais e celulares que seriam mais efetivos na proteção ao organismo (RETNAKUMAR et al., 2023).

Os baculovirus depositam ao redor do seu envelope uma membrana constituída especialmente da proteína granulina, no caso das espécies de granulovirus (GVs) (HARRISON et al., 2022). Essa membrana forma um corpo de oclusão (*occlusion body* - OB) denominado de grânulo. Além de tornar o vírus resistente a condições adversas, quando utilizado como adjuvante molecular, o grânulo tem demonstrando a sua capacidade imunoestimulante, através da promoção da expressão de citocinas antivirais e indução da ativação de células *natural killer* (NK) e linfócitos T (SOSA-GÓMEZ; ARDISSON-ARAÚJO; RIBEIRO, 2022).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial adjuvante do grânulo de baculovirus em uma vacina inativada contra o Alphaherpesvirus bovino 5 (BoHV-5).

2. METODOLOGIA

2.1 Instalações

Os ensaios *in vitro* deste estudo foram realizados junto ao Laboratório de Virologia e Imunologia (Labvir) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Já os

ensaios *in vivo*, foram conduzidos no Centro Agropecuário da Palma, pertencente a UFPel e localizado no município de Capão do Leão-RS.

2.2 Células e vírus

A cepa Rio Pel (R.P.) de BoHV-5 foi amplificada e titulada em células da linhagem *Madin-Darby Bovine Kidney* (MDBK). Estas células foram mantidas em meio essencial mínimo (MEM) Gibco®, acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) Gibco®, 200 U.I./mL de estreptomicina e penicilina (Sigma-Aldrich®), 5 µg/mL de enrofloxacin (Baytril®, Bayer) e 2,5 µg/mL de anfotericina B (Fungizone®, Cristália) e cultivadas com 5% de CO₂ sob temperatura de 37 °C.

2.3 Adjuvantes e preparo das vacinas

A suspensão viral (cepa R.P. de BoHV-5, com título de 10⁷ DICC₅₀/mL) sofreu inativação química através da adição de 1% de bromoetilamina (BEI) (pH 7,8) sob agitação lenta (50 rotações por minuto-rpm) e constante, a temperatura de 22 °C por 12 horas (SILVA et al., 2004).

O hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) 4,3% foi utilizado como adjuvante controle no experimento, e foi inserido na formulação na proporção de 25%. O grânulo de baculovirus foi utilizado na concentração de 100 µg/dose.

Os adjuvantes foram incorporados a suspensão viral através de agitação à 50 rpm, sob temperatura de 4 °C, durante 24 horas, e após homogeneização, as vacinas foram envasadas em recipientes estéreis e posteriormente identificadas.

2.4 Ensaio *in vivo*

Para avaliar o potencial adjuvante do grânulo de baculovirus, 24 ovinos sorologicamente negativos para o BoHV-5 e o BVDV foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais de 6 animais, e inoculadas com três doses vacinais pela via intramuscular nos dias zero, 21 e 42. Os grupos experimentais e as composições vacinais estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1. Grupos e composições vacinais para a avaliação do potencial adjuvante do grânulo de baculovirus em uma vacina inativada contra o BoHV-5

Grupo experimental	Composição	Nº de animais
Controle negativo	Solução salina tamponada (PBS)	6
Controle positivo	Antígeno + MEM + Al(OH) ₃	6
Tratamento 1	Antígeno + MEM + Grânulo	6
Tratamento 2	Antígeno + MEM + Al(OH) ₃ + Grânulo	6

MEM: Meio essencial mínimo; Al(OH)₃: Hidróxido de alumínio.

2.5 Coleta e processamento de material biológico

A coleta de material biológico dos ovinos (sangue em tubos com ativador de coágulo), foi realizada nos dias zero, 21, 42 e 63 após a primeira inoculação. A separação do soro sanguíneo foi realizada através de centrifugação à 3.000 rpm durante 5 minutos. O soro foi coletado em microtubos e o sistema complemento foi inativado em banho-maria a 56 °C durante 30 minutos para posterior utilização. As amostras foram mantidas a -20° C até o momento de uso.

2.6 Soroneutralização

Para a avaliação da resposta imune humoral, e com isso a avaliação do potencial adjuvante conferido pelas vacinas experimentais, a mensuração do título de anticorpos neutralizantes foi realizada através da técnica de soroneutralização. Após sofrerem diluição seriada de 1:2 a 1:256, os soros foram distribuídos (25 µL)

em microplacas de poliestireno (Kasvi®) para posterior adição de 100 TCID₅₀ do vírus BoHV-5 (25µL) e incubação de uma hora, a temperatura de 37 °C, em uma atmosfera de 5% de CO₂. As células da linhagem MDBK foram então adicionadas (50 µL), e as microplacas foram incubadas, sob as condições já citadas, durante 48 a 72 horas (FISCHER et al., 2007).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes aos títulos de anticorpos neutralizantes induzidos pelas vacinas experimentais (Tratamentos 1 e 2), bem como os Controles negativo e positivo do experimento, estão demonstrados na Figura 1. Como pode ser observado, todos os animais incluídos no Tratamento 2, onde o grânulo na concentração de 100 µg/dose foi coadministrado com o hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) e com o antígeno, apresentaram título 4 de anticorpos neutralizantes. Quando comparado aos resultados do Controle positivo, onde somente o Al(OH)₃ foi administrado com o antígeno, nota-se maior título de anticorpos neutralizantes do Tratamento 2. No entanto, quando o antígeno foi administrado com 100 µg/dose do grânulo e sem o Al(OH)₃ (Tratamento 1), somente um animal apresentou título (2) de anticorpos neutralizantes. Esses resultados evidenciam uma co-estimulação entre esta concentração (100 µg/dose) do grânulo de baculovirus e o Al(OH)₃.

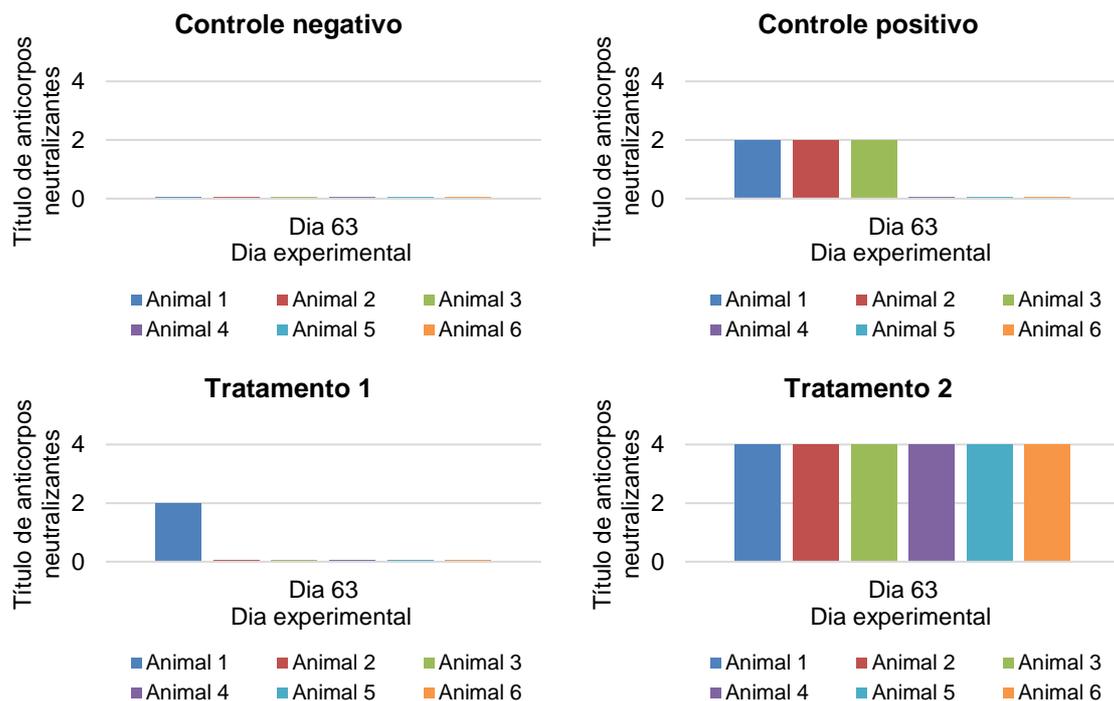


Figura 1. Título de anticorpos neutralizantes induzidos por vacinação contra o Alphaherpesvirus bovino 5 (BoHV-5) no dia 63 após a primeira vacinação. Controle negativo: solução salina tamponada (PBS); Controle positivo: antígeno + meio essencial mínimo + hidróxido de alumínio (Al(OH)₃); Tratamento 1: antígeno + grânulo (100 µg/dose) + meio essencial mínimo; Tratamento 2: antígeno + grânulo (100 µg/dose) + meio essencial mínimo + hidróxido de alumínio (Al(OH)₃).

Considerando referências sanitárias de outros países, Anziliero et al. (2015) toma que as vacinas inativadas ou atenuadas para o BoHV deveriam induzir título de anticorpos neutralizantes ≥ 8 em pelo menos 80% dos animais inoculados, para

sua proteção. Desta forma, os animais inoculados nesta pesquisa não estariam imunizados. No entanto, a descoberta de que o grânulo de baculovirus, além do estímulo à expressão de citocinas antivirais e ativação de células *natural killer* e linfócitos T (SOSA-GÓMEZ; ARDISSON-ARAÚJO; RIBEIRO, 2022) também auxilia na produção de anticorpos neutralizantes em vacinas inativadas, não pode ser desconsiderada.

Todavia, é importante salientar que este experimento é o piloto de um amplo estudo que prospecta substâncias com potencial adjuvante para o desenvolvimento de vacinas, e, portanto, têm como etapa importante o ajuste da concentração em que a substância em questão será utilizada, sendo esse o próximo estágio no estudo do grânulo de baculovirus.

4. CONCLUSÕES

A concentração de 100 µg/dose do grânulo de baculovirus, associado ao hidróxido de alumínio (Al(OH)₃), demonstrou maior potencial adjuvante.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANZILIERO, D. et al. Serological response to bovine herpesvirus 1 and 5 and bovine viral diarrhoea virus induced by commercial vaccines. **Ciência Rural**, v. 45, n. 1, p. 58-64, 2015.

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. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2017.

HARRISON, R.L. et al. **Baculoviridae**. ICTV, 2022. Acessado em 01 de jul. 2023. Online. Disponível em <https://ictv.global/report/chapter/baculoviridae>.

OSTLER, J.B.; JONES, C. The Bovine Herpesvirus 1 Latency-Reactivation Cycle, a Chronic Problem in the Cattle Industry. **Viruses**, v. 15, n. 2, p. 552, 2023.

RETNAKUMAR, S.V. et al. THEME: “Vaccines and Vaccine Adjuvants/Immunomodulators for Infectious Diseases”. **Vaccines**, v. 11, n. 2, p. 383, 2023.

SHI, S. et al. Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvant activity. **Vaccine**, v. 37, n. 24, p. 3167-3178, 2019.

SILVA, L.C. da et al. Avaliação da capacidade adjuvante do cloreto de dimetildioctadecilamônio associado ao hidróxido de alumínio na indução da resposta imune humoral de bovinos vacinados com o vírus da diarréia viral bovina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 3, p. 201-206, 2004.

SÓSA-GÓMEZ, D.R.; ARDISSON-ARAÚJO, D.M.P.; RIBEIRO, B.M. Manejo de pragas com vírus entomopatogênicos. In: MEYER, M.C. et al. **Bioinsumos na cultura da soja**. Distrito Federal: Embrapa, 2022. p. 377-399.