

**SUBUNIDADE B RECOMBINANTE DA ANTICORPO
ESCHERICHIA COLI (rLTB) INDUZ IMUNIDADE DE MUCOSA EM BOVINOS
INOCULADOS POR VIA INTRAVAGINAL**

**NUNES, Fernanda Camargo¹; SIEDLER, Bianca Sica¹; CONCEIÇÃO, Fátima
Rochedo²; ROHE, Paulo³; McFISCHER, Geferson⁴**

¹Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pernambuco, Av. J. Siqueira, 1610, Recife, PE. ²Laboratório de Imunologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pernambuco, Av. J. Siqueira, 1610, Recife, PE. ³Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pernambuco, Av. J. Siqueira, 1610, Recife, PE. ⁴Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Pernambuco, Av. J. Siqueira, 1610, Recife, PE. fcamargonunes@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

Os herpesvirus bovinos tipo 1 (BoHV-1) e tipo 5 (BoHV-5) pertencem a família *Herpesviridae* subfamília *Alphaherpesvirinae*. Esses agentes infectam animais em qualquer faixa etária e são importantes patógenos responsáveis por prejuízos econômicos à bovinocultura (FAVA et al., 2002). O BoHV-1 é o agente causador de rinite infecciosa bovina, doença que cursa com sintomas como conjuntivite e alteração da secreção nasal, podendo também causar abortos e a mortalidade. O BoHV-5 causa meningoencefalite, geralmente fatal. A família *Herpesviridae* se caracteriza por estabelecer latência em gânglios nervos sensoriais, principalmente nos gânglios trigêmeos, podendo ocorrer reativados quando os animais são submetidos a situações de estresse (COLODEL et al., 2002) ocorrendo a reexcreção de partículas infecciosas, pela população bovina (FERREIRA et al., 2000; VIEIRA et al., 2003).

O impacto econômico desta enfermidade deve-se pelo retardo do crescimento de animais jovens, menor produção leiteira e reprodutiva e abortos (BORTOT et al., 2009). Além disso, causa restrição ao comércio internacional de animais e produtos como sêmen, embriões e produtos de biotecnologia, previstas no Código de Sanidade Animal (OIE, 2001).

O controle da infecção pelo herpesvirus baseia-se principalmente na imunização com vacinas inativadas ou vivas modificadas. Contudo, superfícies mucosas são altamente suscetíveis à infecção por micro-organismos patogênicos e epidemiologicamente as vias mucosas são as principais rotas de transmissão do BoHV-1. Este fato evidencia a necessidade do desenvolvimento de vacinas de mucosa para indução de imunidade de barreira e redução da disseminação desses agentes, uma vez que as vacinas disponíveis atualmente não são tão eficazes na indução de respostas mucosas.

As vacinas inativadas são seguras e não estabelecem imunogenicidade, requerem utilização de substâncias adjuvantes para potencializar a resposta (COX ET AL., 1993; JONES & CHOWDHURY, 2008). A subunidade B da proteína de membrana de *Escherichia coli* (LTB) é um potente adjuvante de mucosa, e suas respostas sistêmicas e secretórias (IgA) são potencializadas quando administrados ou acoplados. O objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade secretora de IgAs de uma vacina inativada, de aplicação intravaginal associada à subunidade B recombinante de um *E. coli*.

2 METODOLOGIA

A vacina experimental foi produzida na forma de óvulos inativos, contendo BoHV-5 inativado em um veículo gelatinoso, associado à subunidade B recombinante da antígeno de superfície (rLTB). A rLTB foi produzida a partir de uma cepa de *E. coli* (EEC), isolada de um suínos, modificada por recombinação pelo Centro de Biotecnologia Federal de Pelotas (UFPel), seguindo metodologia conhecida (CONCEIÇÃO et al., 2006).

Para avaliação da vacina experimental, selecionados 30 bovinos com idade entre um e dois anos e sorologicamente negativos para BoHV-5 pelo teste sorológico. Os animais foram divididos em cinco grupos de seis bovinos e inoculados, por via intravaginal, com duas doses dos seguintes tratamentos experimentais: T1 (gelatina + meio essencial), T2 (gelatina + antígeno), T3 (gelatina + 100 µg/óvulo rLTB), T4 (gelatina + antígeno + 50 µg/óvulo rLTB) e T5 (gelatina + antígeno + 100 µg/óvulo rLTB). Foram realizadas duas inoculações, com intervalo de 21 dias, com auxílio de um aplicador (dispositivo intravaginal para controle do ciome bovino), o que permitiu a inserção dos óvulos intravaginalmente.

Para a mensuração dos níveis de IgA nas mucosas, foram realizadas três coletas nos dias zero, 21 e 42. A secreção nasal foi coletada em suabe nasal, de ambas as narinas e a secreção vaginal foi coletada em suabe (tampão de algodão) colocado profundamente com auxílio de um aplicador para CIDR®, eretida por quatro horas. A avaliação dos níveis de IgA das mucosas nasal e vaginal foi realizada através de um teste do tipo ELISA indireto, conforme Dummer et al. (2008).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido à importância da imunidade nas superfícies mucosas, a imunização intravaginal dos bovinos, é de grande importância no desenvolvimento de vacinas que propiciem altos níveis de imunoglobulinas (IgAs) nestes locais, visto que as vacinas disponíveis comercialmente carecem desta capacidade. Segundo Ansel et al. (2000) demonstrou que a inserção intravaginal de vacinas dissolúveis, agindo como veículo de agentes terapêuticos sistêmicos ou localizados.

A utilização de 50 e 100 µg/dose nos tratamentos T4 e T5, respectivamente, proporcionou níveis mais elevados de IgA ($P < 0,05$) na mucosa vaginal, em relação aos tratamentos T1, T2 e T3, como observado na Fig. 1, tanto na segunda quanto na terceira coleta. Este resultado corrobora com estudos desenvolvidos por Simmons et al. (2001) e Tochikubo et al. (1998) que caracterizaram a LTB como uma molécula potente como adjuvante e indutora de imunidade de mucosa.

Além de proporcionar níveis elevados de IgA, a utilização de 50 e 100 µg/dose de rLTB induziu, também, níveis significativamente superiores ($P < 0,05$) de IgA na mucosa nasal, o que foi observado na terceira coleta (Fig. 2). No entanto, na segunda coleta, a dose de 100 µg/dose de rLTB não diferiu estatisticamente dos tratamentos controle, enquanto a dose de 50 µg/dose de rLTB foi estatisticamente superior aos demais tratamentos ($P < 0,05$),

demonstrando a necessidade de mais doses vacinais quando a concentração de rLTB foi mais baixa.

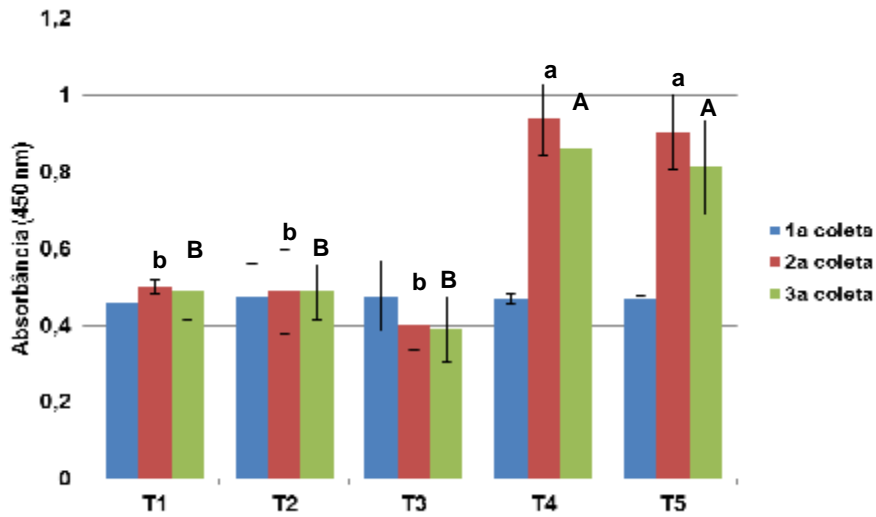


Figura 1: Níveis de IgA determinados pelo EIA vaginal de bovinos inoculados com vacinas inativadas contra o BoHV-5, associadas ou não à rLTB, inoculadas por via

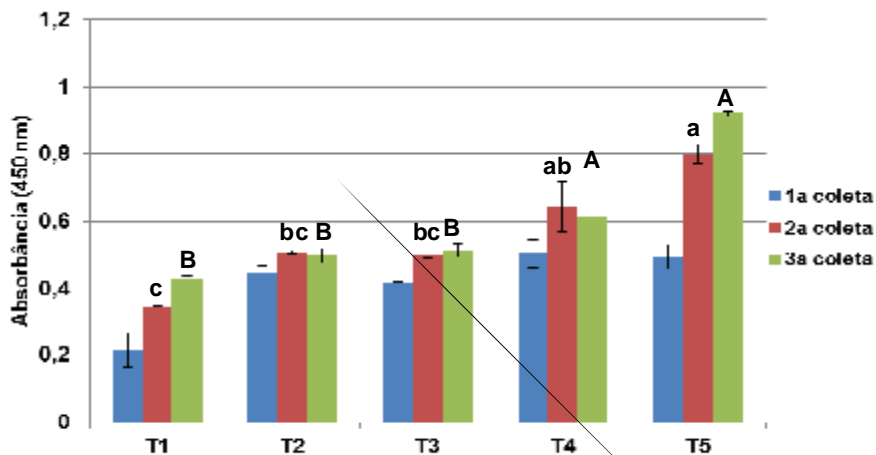


Figura 2: Níveis de IgA determinados pelo EISA nasal de bovinos inoculados com vacinas inativadas contra o BoHV-5, associadas ou não à rLTB, inoculadas por via

4 CONCLUSÃO

As doses de rLTB utilizadas na vacina experimental contra o BoHV-5, de administração intravaginal, demonstraram ser eficazes na elevação da produção de níveis elevados de IgA nas mucosas nasais de bovinos, determinados por EIA indireto, em relação aos pontos controle. Este fato torna-se de grande relevância para considerar-se que as mucosas vaginais e nasais são as principais vias de infecção por BoHV-5 e que as vacinas atuais utilizadas contra estes vírus carecem da capacidade de estimular a produção de IgA na mucosa.

5 REFERÊNCIAS

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR, L. V. **Farmacotécnicas farmacêuticas e sistematização de fármacos**. P : Prudent, 6ª edição, 2000. 568p.

BORTOT, D. C ; BARIAN, M H ; ZAPPALAV. R Bovina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina**, ISSN: 1679-7353, ano VII, n.12, 2009.

CERQUEIRA, R.B.; CARMINATI, R.; SILVA, J.M.; SOARES, G.C.; MEYER, R.; SARDI, S. Serological survey for bovine herpesvirus 1 in cattle from different regions in the state of Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n.6, p.1-8, 2000.

COLODEL, E.M.; NAKAZATO, L.; WEIBLEN, R.; MELLO, R.M.; SILVA, R.R.P.; SOUZA, M.A.; FILHO, J.A.O.; CARON, L. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino tipo 1. **Revista de Medicina Veterinária Rural**, v.30, n.2, p. 293-298, 2002.

CONCEIÇÃO 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**, v.24, p.5734-5743, 2006.

COX, G. J. M.; ZAMB, T.J.; BABIUK, L. A. Bovine Herpesvirus 1: immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. **Journal of Virology**, v.67, n.9, p.10 5664-5667, 1993.

DUMMER, L. A.; ROSS, T. B.; MORAES, C. M. et al. Aplicação da glicoproteína Herpesvírus Bovino tipo 5 expressa em plasmídeo em patógenos sológenos por ELISA. **ANEXO 1 - CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA**, Natal, 2008. Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária.

FAA, C D.; PTUCCO, E M; D'AVILA, G. Herpesvírus Bovino tipo 1 - revisão sobre a situação atual no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária - CRMV-SP**, v.5, n.3. p.300-312, 2002.

JONES, C.; CHOWDHURY, S. A review of the biology of Bovine Herpesvirus type 1, its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. **Animal Health Research Reviews**, v.8, n.2, p.187-205, 2008.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. List B Diseases: Infectious Bovine Rhinotracheitis/Infectious Pustular Vulvovaginitis (IBR-IPV). In: **International Animal Health Code**. Paris: OIE, 2001. Disponível em: <http://www.oie.int/News/Code/htm>

SIMMONS, C.P.; GHAEM-MAGAMI, M.; PETROVSKA, L. et al. Immunomodulation using bacterial enterotoxins. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.53, p.218-226, 2001.

TOCHIKUBO, K.; ISAKA, M.; YASUDA, Y. et al. Recombinant cholera toxin B subunit acts as an adjuvant for the mucosal and systemic responses of mice to mucosally co-administered bovine serum albumin. **Vaccine**, v.16, n.213, p.150-155, 1998.

VIEIRA, S.; BRITO, W.M.E.D.; SOUZA, W.J.; ALFAIA, B.T.; LINHARES, D.C.L. Anticorpos para o herpesvírus bovino tipo 1 em bovinos do Estado de Minas Gerais. **Análise Veterinária Brasileira**, v.4, n.2, p. 131-137, 2003.