

Amanda Soriano Araújo

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS FORMULAÇÕES DE VACINAS
INATIVADAS E DE SUBUNIDADES UTILIZANDO O PARVOVÍRUS
SUÍNO COMO MODELO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Marcos Bryan Heinemann

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2012**

A663d Araújo, Amanda Soriano, 1979-
Desenvolvimento de novas formulações de vacinas inativadas e de subunidades
utilizando o parvovírus suíno como modelo / Amanda Soriano Araújo. – 2012.
80 p. : il.

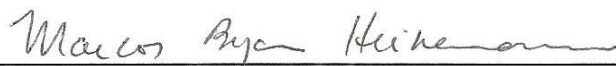
Orientador: Marcos Bryan Heinemann

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

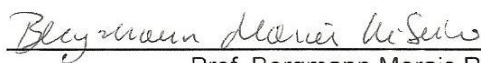
1. Suíno – Doenças – Teses. 2. Parvovírus – Teses. 3. Vacina veterinária – Teses.
I. Heinemann, Marcos Bryan. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de
Veterinária. III. Título.

CDD – 636.408 96

Tese defendida e aprovada em 31 de maio de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Marcos Bryan Heinemann
Presidente



Prof. Bergmann Morais Ribeiro



Profª. Eliana Martins Lima



Prof. Francisco Carlos Faria Lobato



Profª. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes

AGRADECIMENTOS

Ao meu filho Theodoro: obrigado por transformar a minha vida no maior dos doutorados! Você é meu melhor título!

À minha família, em especial: marido Marcos Barezani, mamãe Valéria, rimãzinha Bárbara, tia Vanessa: por cuidarem tão bem de mim e, principalmente, do Theo enquanto eu concluía este trabalho.

Ao professor Marcos Bryan Heinemann: grande mestre, grande amigo!

Aos professores: Zélia Inês Portela Lobato, Armando da Silva Cunha Junior, Bergmann Morais Ribeiro: ajuda imprescindível, gratidão eterna!

Aos amigos, funcionários e agregados do Labvirus: tudo fica mais leve com vocês ao lado!

Ao CNPq pelo apoio financeiro: pesquisar é bom, mas com bolsa é extremamente melhor!

Dedico este trabalho à Deus e ao meu marido Marcos Lemos Barezani, por me darem o melhor presente da minha vida: Theodoro Hastenreiter Barezani.

SUMÁRIO		Pág.
ABREVIATURAS		9
RESUMO		14
ABSTRACT		14
1. INTRODUÇÃO		14
2. LITERATURA CONSULTADA		16
2.1. Parvovirose suína.....		16
2.1.1. Introdução.....		16
2.1.2. Etiologia.....		17
2.1.3. Estrutura e organização do genoma viral.....		19
2.1.4. Resposta imune na PVS.....		20
2.1.4.1. Ao VLP do PVS.....		20
2.1.4.2. Na parvovirose suína.....		20
2.1.5. Controle.....		21
2.2. Adjuvantes.....		22
2.2.1. Introdução.....		22
2.2.2. Adjuvantes à base de hidróxido de alumínio.....		26
2.2.3. Emulsões tipo óleo/água.....		26
2.2.4. Emulsões múltiplas.....		26
2.2.5. Microemulsões.....		27
2.2.6. Microesferas e implantes de quitosana.....		28
3. OBJETIVO		29
3.1. Geral.....		29
3.2. Específicos.....		29
4. MATERIAL E MÉTODO		29
4.1. Locais de realização do experimento.....		29
4.2. Cultivo celular e obtenção do antígeno.....		29
4.2.1. Suspensão viral.....		29
4.2.2. Células.....		29
4.2.3. Titulação viral.....		30
4.2.4. Inativação viral.....		30
4.2.5. Verificação da inativação viral.....		30
4.2.6. Teste de esterilidade da suspensão viral.....		30
4.3. Obtenção dos adjuvantes.....		30
4.3.1. Materiais utilizados.....		30
4.3.1.1. Para o preparo das emulsões múltiplas e microemulsões.....		30
4.3.1.2. Para o preparo das microesferas e implantes de quitosana.....		31
4.3.2. Preparo da emulsão múltipla.....		31
4.3.3. Preparo da microemulsão.....		32
4.3.4. Preparo das microesferas de quitosana.....		33
4.3.5. Preparo dos implantes de quitosana.....		34
4.4. Teste de inocuidade.....		34
4.4.1. Inoculação dos adjuvantes.....		34
4.4.2. Análise das lesões decorrentes da aplicação dos adjuvantes.....		35
4.5. Obtenção das VLPs.....		36
4.5.1. Estabelecimento da cultura de células de insetos no Laboratório de Cultivo Celular da escola de Veterinária da UFMG.....		36
4.5.2. Padronização de uma PCR para amplificação do gene da proteína VP2 do PVS.....		36
4.5.3. Sequenciamento do gene amplificado pela PCR padronizada.....		37
4.5.4. Clonagem do gene VP2 em pGem T-easy® e pFastBac Dual®.....		37

4.5.5. Obtenção dos bacmídeos e baculovírus recombinantes com VP2 (VLP-PPS).....	37
4.5.6. Transfecção das células de inseto com o baculovírus recombinante.....	37
4.6. Obtenção das vacinas inativadas.....	39
4.6.1. Material utilizado.....	39
4.6.1.1. Para o preparo das vacinas aquosas a base de hidróxido de alumínio.....	39
4.6.1.2. Para o preparo das vacinas a base de emulsão óleo-água.....	39
4.6.1.3. Vacina comercial.....	39
4.6.2. Elaboração da vacina a base de microemulsão.....	39
4.6.3. Elaboração da vacina em microesfera de quitosana.....	39
4.6.4. Elaboração da vacina em implantes de quitosana.....	40
4.6.4.1. Teste para verificação do índice de adsorção viral às microesferas de quitosana.....	40
4.6.5. Elaboração da vacina aquosa a base de hidróxido de alumínio.....	40
4.6.6. Elaboração da vacina oleosa a base de emulsão água-óleo.....	40
4.7. Obtenção das vacinas de subunidades.....	40
4.8. Testes:.....	41
4.8.1. Estabilidade.....	41
4.8.2. Esterilidade.....	41
4.8.3. Teste de potência em cobaias.....	41
4.9. Análise estatística.....	42
5. RESULTADOS.....	42
5.1. Obtenção do antígeno.....	42
5.1.1. Inativação viral.....	42
5.1.2. Teste de esterilidade da suspensão viral.....	42
5.2. Obtenção dos adjuvantes.....	42
5.2.1. Emulsão Múltipla.....	42
5.2.2. Microemulsão.....	45
5.2.3. Microesferas de quitosana.....	46
5.2.4. Implantes de quitosana.....	46
5.3. Análise das lesões decorrentes da aplicação dos adjuvantes.....	46
5.3.1. Análise macroscópica.....	48
5.3.1.1. Microemulsão.....	48
5.3.1.2. Emulsão Multipla.....	48
5.3.1.3. Microesferas de quitosana.....	49
5.3.1.4. Implantes de quitosana.....	49
5.3.2. Análise microscópica.....	50
5.4. Obtenção das VLP do PVS.....	56
5.4.1. Padronização da PCR.....	56
5.4.2. Clonagem do gene VP2 nos vetores pGem T-easy e pFastBac Dual e obtenção dos bacmídeos e baculovírus recombinantes.....	57
5.4.3. Transfecção das células TN5-B com o baculovirus recombinante e análise de proteínas expressa por estas células.....	58
5.5. Obtenção das vacinas.....	61
5.5.1. Elaboração da vacina aquosa.....	61
5.5.2. Elaboração da vacina oleosa a base de emulsão O/A.....	61
5.5.3. Elaboração de vacinas a base de microesferas e implantes de quitosana.....	61
5.5.3.1. Verificação do índice de adsorção viral às partículas de quitosana.....	61
5.5.4. Elaboração de vacinas a base de microemulsão.....	61
5.5.5. Elaboração de vacinas de subunidades.....	62
5.6. Testes.....	62

5.6.1. Estabilidade.....	62
5.6.2. Esterilidade.....	62
5.6.3. Potência em cobaias.....	63
6. DISCUSSÃO.....	66
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	70
8. CONCLUSÃO.....	71
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
10. ANEXOS.....	80

ABREVIATURAS

ACF	Adjuvante Completo de Freund
AIF	Adjuvante Incompleto de Freund
BPL	beta-propiolactona
ATCC	American Type Culture Collection
CAA	Células Apresentadoras de Antígenos
CETEA	Comitê de Ética e Experimentação Animal
CTL	Linfócito T citotóxico (CD8 ⁺)
EM	Emulsão múltipla
EP	Emulsão primária
HA	Hemaglutinação
HI	Inibição da Hemaglutinação
IL	Interleucina
INF	Interferon
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
LPS	Lipopolissacarídeo
MDP	N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (componente ativo do <i>Mycobacterium</i>)
ME	Microemulsão
MEM	Meio Essencial Mínimo
MHC-I	Complexo Principal de Histocompatibilidade do tipo I
MHC-II	Complexo Principal de Histocompatibilidade do tipo II
ORF	Janela aberta de leitura de um gene (que inicia-se na sequência de um promotor e termina na sequência de um códon de terminação)
PBS	Salina Fosfato Tamponada
PPV	Porcine parvovirus
PVS	Parvovirus Suíno
PVS-VLP	Partículas semelhantes ao parvovírus suíno
SAF/MDF	Syntex Adjuvant Formulation (análogo do MDP)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilssulfato de sódio
VLP	<i>Virus Like Particles</i> (Partículas Semelhantes A Vírus)
TNF- β	Fator de Necrose Tumoral Beta
UHA	Unidades hemoaglutinantes
USDA	Ministério da Agricultura dos Estados Unidos

LISTA DE TABELAS		Pág.
Tabela 1	Formulações testadas para formação de EP durante a primeira etapa de emulsificação, para produção do adjuvante caracterizado pela Emulsão Múltipla.....	43
Tabela 2	Formulações testadas para formação de EM durante a segunda etapa de emulsificação, para produção do adjuvante caracterizado pela Emulsão Múltipla.....	44
Tabela 3	Médias de temperatura de cobaias inoculadas com os adjuvantes formulados, por via subcutânea, medida durante os primeiros 7 dias de observação.....	47
Tabela 4	Evolução das lesões causadas pela inoculação dos adjuvantes formulados.....	54
Tabela 5	Padronização da PCR para amplificação do gene VP2 do Parvovirus Suíno.....	56
Tabela 6	Resultados do teste de Hemoaglutinação e da Dosagem de Proteínas realizados antes e depois da adsorção da suspensão viral às partículas de quitosana.....	61
Tabela 7	Títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação encontrados nos soros dos animais imunizados com as vacinas formuladas.....	64
LISTA DE QUADROS		
Quadro 1	Comparação entre a emulsão simples e a microemulsão (adaptado de LAWRENCE e REES, 2000)	28
Quadro 2	Cronograma utilizado durante o teste de inocuidade dos adjuvantes formulados	35
Quadro 3	Relação dos grupos experimentais utilizados no teste de potência das vacinas formuladas.....	41
Quadro 4	Lesões decorrentes da aplicação das vacinas.....	63
Quadro 5	Diferença estatística dos resultados do teste de potência, considerando significativos os valores de $p < 0,05$	66
LISTA DE FIGURAS		
Figura 1	Representação esquemática da estrutura do genoma do PVS, com a localização das regiões que codificam as proteínas estruturais e não estruturais (STRECK, 2009). As duas janelas de leitura estão representadas em azul claro. A fase de leitura 1 é responsável pela codificação das proteínas não estruturais NS-1, NS-2 e NS-3 através de diferentes <i>splicing</i> do gene da NS-1. A fase de leitura 2 é responsável pela codificação das proteínas VP-1 e VP-2 através de diferentes <i>splicing</i> do gene da VP-1. Já a VP-3 é produzida após clivagem pós traducional da proteína VP-2.....	18
Figura 2	Visualização esquemática do <i>Parvovirus</i> (adaptação de TSAO et al, 1991), mostrando as estruturas presentes na superfície viral. O triângulo representa uma das 60 subunidades repetitivas que compõem o capsídeo viral completo. Cada subunidade é composta de dois <i>spikes</i> (porção 3-fold), um <i>canyon</i> (porção 5-fold) e um <i>dimple</i> (porção 2-fold)	19
Figura 3	Esquema do efeito da inibição mútua entre as respostas Th1 e Th2, mostrando o efeito estimulatório (setas azuis contínuas) e inibitório (setas vermelhas pontilhadas) de algumas citocinas sobre a produção de outras citocinas e sobre a própria proliferação celular (adaptação de COX e COULTER, 1997 e ROITT, BROSTOFF e MALE, 1996)	24
Figura 4	Representação esquemática de uma emulsão múltipla, demonstrando a fase aquosa externa englobando uma fase interna composta de uma emulsão água em óleo	27
Figura 5	Representação esquemática da estrutura das microemulsões (adaptado de OLIVEIRA et al, 2004), onde a micela é formada com o uso de um emulsionante e é estabilizada com o uso de um co-emulsionante.....	28

Figura 6	Obtenção da Emulsão Múltipla através do método da dupla emulsificação. Na primeira etapa é preparada uma emulsão primária do tipo água em óleo, sob agitação elevada. Posteriormente, esta emulsão primária é vertida lentamente sobre uma segunda fase aquosa contendo emulsionante lipofílico, então submetida a uma agitação mais baixa.....	32
Figura 7	Obtenção da microemulsão através do método da titulação com co-emulsionante modificado. Na fase 1 é preparada uma emulsão simples óleo-água com elevada concentração de emulsionante hidrofílico. Na fase 2 é adicionado um co-emulsionante, que é mantido sob elevada agitação até a obtenção da microemulsão.....	32
Figura 8	Esquema demonstrando a obtenção das esferas de quitosana. Primeiramente, quitosana em pó foi adicionada a uma solução aquosa ácida. Após sua completa diluição, uma solução de sulfato de sódio foi adicionada e a mistura foi mantida sob baixa agitação durante 24 horas. As microesferas obtidas foram então lavadas e centrifugadas três vezes antes de serem liofilizadas.....	33
Figura 9	Obtenção dos implantes de quitosana a partir da prensagem das microesferas de quitosana.....	34
Figura 10	Introdução cirúrgica do implante de quitosana no tecido subcutâneo de animal submetido ao teste de inocuidade.....	34
Figura 11	Aferição da espessura da pele para estudo da intensidade das reações inflamatórias locais.....	35
Figura 12	Mapa do plasmídeo pFastBac Dual® utilizado como vetor de expressão durante a clonagem do gene VP-2 do PVS em Sistema Baculovírus.....	36
Figura 13	Esquema demonstrando como foram obtidos os bacmídeos e baculovírus recombinantes contendo o gene da VP utilizando o kit de expressão em células de inseto Bac to Bac Baculovirus Expression Systems® (Invitrogen™).....	38
Figura 14	Foto de lâmina de microscopia optica mostrando os glóbulos que evidenciam (A) a formação emulsão múltipla e (B) a ruptura destes glóbulos após a desestabilização da emulsão múltipla (aumento 1000X).....	45
Figura 15	Aspecto visual dos adjuvantes formulados: (1) Microesferas de quitosana após reconstituição, (2) Microemulsão e (3) Emulsão Múltipla.....	45
Figura 16	Aspecto das microesferas de quitosana.....	46
Figura 17	Implante de quitosana.....	46
Figura 18	Médias de espessura da pele ou diâmetro de lesão de cobaias inoculadas com os adjuvantes formulados, por via subcutânea, medida durante os primeiros 14 dias de observação.....	47
Figura 19	Teste de inocuidade. Lesões na pele dos cobaias 15 dias após a inoculação dos adjuvantes: Microemulsão (A e A'), Emulsão múltipla (B e B'), Microesferas de quitosana (C e C') e Implantes de quitosana (D e D').....	48
Figura 20	Avaliação macroscópica das lesões causadas pela inoculação da Emulsão Múltipla em cobaias após 21 dias de observação. Lesão ulcerativa (A) foi verificada em dois dos animais avaliados. Os outros dois animais apresentaram uma lesão nodular no local da aplicação (B). Aspecto da lesão no tecido subcutâneo (C) e do material retirado do centro dessa lesão (D).....	49
Figura 21	Corte histológico da área onde foi inoculada a Microemulsão, 15 dias após a inoculação. (A) e (B) Intenso infiltrado inflamatório circundado por fibroplasia (aumento 100X), (C) Aspecto basofílico do material encontrado no centro desse infiltrado (aumento 100X). (D) Fibroplasia acentuada (aumento 400X).....	50
Figura 22	Corte histológico da área onde foi inoculada a Emulsão Múltipla, 15 dias após a inoculação. (A) extenso infiltrado inflamatório piogranulomatoso	

	circundando material eosinofílico (aumento de 40X), (B) e (C) Aspecto fracamente eosinofílico do material (aumento de 100X) e (D) Intensa hemorragia (aumento de 400X).....	51
Figura 23	Corte histológico de um nódulo causado pela inoculação das Microesferas de Quitosana, 15 dias após a inoculação. (A)Corte em pequeno aumento mostrando toda estrutura do nódulo (aumento de 40X), (B) Intenso infiltrato inflamatório do tipo piogranulomatoso delimitado por um cápsula fibrosa (aumento de 100X), (C) Aspecto granular e amorfo do material encontrado no centro do infiltrado, de coloração fortemente eosinofílica (aumento de 100X) e (D) fibroplasia delimitando o infiltrado descrito (aumento de 400X).....	52
Figura 24	Corte histológico de um nódulo causado pela inoculação de um Implante de Quitosana, 15 dias após a inoculação. (A) Corte em pequeno aumento mostrando a estrutura do nódulo (aumento de 40X) com área de necrose central(*), (B) extensa camada de fibroplasia delimitando material intensamente eosinofílico (aumento de 100X), (C) Aspecto do material intensamente eosinofílico, sólido e linear encontrado no centro do infiltrado (aumento de 100X) e (D) presença de células gigantes (seta) e macrófagos espumosos (aumento de 400X).....	53
Figura 25	Gel de agarose 1% mostrando eletrofore contendo o gene da VP2 amplificado. Canaleta 1 contendo padrão (1kb Plus DNA Ladder, Invitrogen). Canaleta 2 contendo fragmento de DNA com tamanho entre 1650 e 2000pb (VP2=1740pb + seqüências alvo das enzimas de restrição).....	56
Figura 26	Confirmação da clonagem em pGem-T Easy. (A) Esquema demonstrando o plasmídeo gerado, (B) Esquema demonstrado a digestão com <i>EcoRI</i> e o tamanho dos fragmentos resultantes da digestão e (C) Gel de agarose 1% contendo fragmentos de aproximadamente 970 e 790pb (VP2 digerida) e 3000pb (plasmídeo). Primeira canaleta com padrão (1kb DNA Ladder, Fermentas).....	57
Figura 27	Confirmação da clonagem em pFastBac Dual®. Foto de gel de agarose 1% contendo fragmentos de aproximadamente (A) 5973pb e 976pb, gerados após a digestão com <i>EcoRI</i> , (B) 5663pb e 1286pb, gerados após a digestão com <i>HindIII</i> e (C) 5313pb, 963pb e 673pb, gerados pela digestão com <i>NsiI</i> . Primeira canaleta com padrão (1kb Plus DNA Ladder, Invitrogen).....	58
Figura 28	Confirmação da transposição ocorrida dentro da bactéria <i>E. coli</i> DH 10 Bac®. Foto de gel de agarose 1% contendo (1) padrão de peso molecular (Gene Ruler 1kb, ready-to-use, Fermentas) e (2) fragmento de cerca de 1740pb gerado após PCR de uma das colônias de <i>E. coli</i> DH 10 Bac® selecionada após transformação do plasmídeo pFastBacDual-VP2.....	59
Figura 29	Células TN5-B (A) não transfectadas e (B) 72 horas após transfecção, apresentando efeito citopático (células mais arredondadas, em menor número, não aderidas à placa e com núcleos hipertrofiados).....	59
Figura 30	Análise de expressão de proteínas pelas células TN5-B transfectadas com o baculovírus recombinante produzido. Foto de gel de poliacrilamida mostrando a expressão de uma proteína de pouco mais de 60KDa por estas células (vACVP2). Esta proteína não estava sendo expressa por células TN5-B não infectadas (Mock) ou infectadas por outros baculovírus que não o recombinante (AcMNPV e vApolhcyt).....	58
Figura 31	Foto de microscopia eletrônica mostrando células TN5-B após 72 horas de infecção com o vírus recombinante AcVp2.....	60
Figura 32	Aspecto visual das vacinas obtidas: (1) hidróxido de alumínio, (2) emulsão O/A, (3) microesferas de quitosana e (4) microemulsão.....	62
Figura 33	Aspecto visual das vacinas de subunidades obtidas: (1) hidróxido de alumínio,	62

	(2) microemulsão e (3) sem adjuvante.....	
Figura 34	Médias geométricas dos títulos de anticorpos anti-parvovirus suínos frente às diversas formulações de vacina	65

RESUMO

Movidos pelo desafio de desenvolver vacinas mais eficientes, baratas e com tecnologia nacional e de testar novos candidatos a adjuvantes vacinais em medicina veterinária, este trabalho propôs o estudo de novas formulações de vacinas inativadas e de subunidades utilizando o parvovirus suíno (PVS) como modelo. Quatro formulações de adjuvantes biocompatíveis e metabolizáveis foram desenvolvidas. Suspensão inativada do PVS contendo 1024 UHA foi utilizada para produzir vacinas com os seguintes adjuvantes: emulsão múltipla, microemulsão, microesferas de quitosana e implantes de quitosana. Também foram desenvolvidas vacinas de subunidades contendo os adjuvantes formulados, obtidas através da clonagem do gene da proteína VP2 do capsídeo viral do parvovirus suíno em sistema baculovirus. As partidas produzidas foram submetidas a testes de estabilidade, inocuidade, esterilidade e potência. A resposta imune foi avaliada a partir da vacinação de cobaias (modelo de referência) e do acompanhamento dos títulos de anticorpos pelo teste de inibição da hemoaglutinação. Das quatro formulações de adjuvantes avaliadas no teste de inocuidade em cobaias, somente a emulsão múltipla não foi aprovada por causar extensas lesões na pele e carcaça dos animais inoculados. Micropartículas de quitosana, implantes de quitosana e microemulsões podem ser utilizadas como adjuvante em vacinas contra o PVS, induzindo a produção de altos títulos de anticorpos. Vacinas de subunidades contendo PVS-VLP são capazes de induzir a produção de altos títulos de anticorpos anti-parvovirus suíno, mesmo sem a presença de adjuvante na composição da vacina.

Palavras-chave: VLP, Vacinas, adjuvantes, Parvovirus suíno, Emulsão múltipla, Microesferas de quitosana, implantes de quitosana.

ABSTRACT

The objective of this work is to develop new formulations of inactivated and subunit vaccines using porcine parvovirus (PVS) as a model. Four adjuvant formulations have been developed, i) multiple emulsion, ii) microemulsion, iii) chitosan microspheres and iv) implants of chitosan. It has been developed a virus like particle (VLP-PVS) vaccine using baculovirus system. 1024 UHA of PVS suspension was used to produce the vaccines. The vaccines produced were tested for stability, safety, sterility and potency. The immune response was evaluated using vaccination of guinea pigs and the monitoring of antibody titers by hemagglutination inhibition test. The safety test showed that only the multiple emulsion was not approved by causing extensive skin and muscle lesions in the guinea pigs. The PVS vaccines with chitosan microparticles or implants of chitosan or microemulsions increased the titer of antibodies. And PVS-VLP was capable of inducing the production of high titers of antibodies to swine parvovirus even without the presence of adjuvant in the vaccine composition.

Key Words: VLP, porcine parvovirus, adjuvant, vaccine, multiple emulsion, microemulsion, chitosan microspheres, implants of chitosan.

1. INTRODUÇÃO

O estudo de novos adjuvantes para uso em vacinas inativadas com o objetivo de

promover uma resposta imune humoral e celular mais efetiva é de extrema importância em medicina veterinária. Adjuvantes contendo sistemas de liberação

de antígenos como o hidróxido de alumínio e a emulsão óleo/água são os mais utilizados nas vacinas comerciais, porém, em muitos casos, a eficiência destas vacinas não é boa, promovendo apenas uma proteção parcial, níveis de anticorpos protetores de curta duração e/ou estímulo de resposta celular deficiente (MOLITOR et al, 1985).

Os adjuvantes podem agir por imunomodulação do sistema imune, estimulação de linfócitos T citotóxicos, direcionamento dos antígenos a células apresentadoras de antígenos e/ou formação de depósitos prolongando a liberação dos antígenos. O uso de adjuvantes pode favorecer uma ou ambas as formas de apresentação do antígeno, estimulando linfócitos B ou T, permitindo uma resposta mais eficiente e duradoura, tanto para anticorpos, quanto para a mediada por células, além do desenvolvimento de células de memória (GUALANDI et al, 1988; CASAL, 1999).

Além das pesquisas direcionadas às substâncias químicas como candidatos a potentes adjuvantes, atualmente, um grande número de antígenos exógenos modificados vem sendo desenvolvidos com o objetivo de melhorar a atividade MHC classe I. Entre eles temos as “partículas semelhantes a vírus” (*virus like particles-VLP*), que são partículas virais não replicativas capazes de entrar na célula alvo, chegar ao citoplasma e estabelecer a partir de então uma resposta do tipo celular e podendo também estimular a resposta de anticorpos (MARTINEZ et al, 1992). VLP de parvovírus são semelhantes aos virions naturais, estáveis em condições ambientais extremas e altamente imunogênicas. Baixas doses são suficientes para conferir proteção, não necessitando obrigatoriamente do uso de adjuvantes para estimulação de uma boa resposta imune (SEDLIK et al, 1997). É um antígeno seguro que, por não possuir ácido nucleico,

é incapaz de se replicar dentro das células vivas e causar reversão de patogenicidade.

O parvovírus suíno (PVS), agente etiológico de uma doença que está entre as principais causas de perdas reprodutivas na suinocultura, é um vírus capaz de formar VLP. Presente em quase 100% das granjas comerciais de todo o mundo, o PVS é extremamente resistente ao ambiente. Além de causar mumificação fetal, sua principal manifestação clínica, esta enfermidade também é responsável por outros problemas reprodutivos em fêmeas prenhes como retorno ao cio devido à morte embrionária na fase precoce da gestação e nascimento de leitgadas pequenas, com menos de seis leitões por parto (VAN LEENGOED et al, 1983). Sendo um vírus estável e de rápida disseminação, a vacinação é o único método eficiente de controle da parvovirose suína em uma granja (GARDNER et al, 1996). A duração da imunidade conferida aos animais naturalmente infectados é longa, podendo permanecer por meses ou até anos. Entretanto, os títulos de anticorpos protetores conferidos através da vacinação não são duradouros, permanecendo altos por cerca de quatro meses, sendo que após este período o animal estará susceptível a nova infecção (ORAVAINEN et al, 2006). Além disso, são necessárias duas doses da vacina antes da cobertura e várias revacinações após o parto, o que torna a vacinação contra a parvovirose suína uma prática muito cara.

Portanto, considerando a grande importância econômica da parvovirose suína, a necessidade de se desenvolver novas formulações de vacinas mais baratas e eficientes e com tecnologia nacional para utilização no controle de enfermidades na medicina veterinária, este projeto propôs o estudo de novas formulações de vacinas contendo novos candidatos a adjuvantes utilizando o parvovírus suíno como modelo.

2. LITERATURA CONSULTADA

2.1. Parvovirose suína

2.1.1. Introdução

A parvovirose suína está amplamente distribuída do mundo, sendo uma das mais frequentes causas de falhas reprodutivas em suínos. No Brasil, vários estudos sorológicos evidenciaram o PVS como agente circulante dentro das granjas comerciais (GOUVEIA et al, 1984; MARTINS et al, 1984; BERSANO et al, 1993 e 1995). Esta doença só se manifesta em fêmeas prenhes, principalmente em primíparas (MORAES e COSTA, 2007; ROEHE et al, 2007), onde a infecção embrionária e/ou fetal poderá ocasionar morte embrionária, mumificação fetal, abortamentos, natimortalidade e nascimento de um número reduzido de leitões (MENGELING et al, 2000), além de infertilidade e repetição de cio. Estas manifestações estão diretamente relacionadas com o período gestacional em que a fêmea se infectou.

Um dos fatores que mais contribuem para a grande disseminação do PVS é a sua enorme capacidade de resistência a condições adversas fora do hospedeiro. Por não possuir envelope lipídico, este vírus é capaz de resistir a muitos dos desinfetantes utilizados em granjas comerciais (BROWN, 1981). Ele pode sobreviver por até quatro meses em excreções e secreções de suínos (MENGELING e PAUL, 1986), além de possuir a capacidade de resistir a grandes variações de temperatura e pH (CARTWRIGHT et al, 1969; MENGELING, 1972).

A transmissão oronasal é a principal via de infecção em animais adultos (MENGELING, 1999). O vírus multiplica-se nos linfonodos próximos à via de entrada e depois alcança a circulação. Com a viremia, o vírus pode alcançar vários órgãos, sendo então eliminados por até duas

semanas em todas as secreções e excreções (MCADARAGH e ANDERSON, 1975; GRADIL et al, 1990). Se o animal infectado for macho adulto, leitão ou fêmea não prenhe há apenas uma soroconversão, sem nenhuma sintomatologia clínica. Se o animal for uma fêmea em gestação, o vírus, que tem tropismo por células em multiplicação, atinge o embrião ou feto, encontrando aí um ambiente altamente favorável à sua replicação devido à alta taxa de mitose que a maioria destes tecidos apresenta.

Por possuírem placenta epitélio-corial, as células que formam as camadas placentárias nos suínos estão intimamente ligadas por junções que não permitem a troca de pequenas moléculas entre a mãe e o concepto, como anticorpos, por exemplo. Ainda não se conseguiu elucidar como se dá a passagem viral pela barreira transplacentária, já que a partícula viral é muito grande para fazê-lo (WILHELM et al, 2005). Estudo recente demonstrou que fetos suínos em fase precoce de desenvolvimento fazem com que suas placentas sofram um alargamento entre suas junções celulares, permitindo maior passagem de nutrientes e moléculas, sendo esta uma hipótese para explicar a infecção do concepto (VALLET e FREKING, 2007). Outra teoria mais aceita seria a de que as células do sistema imune materno alcançam o ambiente fetal, sendo esta a rota utilizada pelo vírus para atingir o feto. Esta teoria é reforçada pela descrição da presença do PVS em tecidos linfóides de animais adultos (LUCAS et al, 1974; MENGELING et al, 2000), pelo relato de que monócitos periféricos e macrófagos fagocitam o PVS (KRAKOWKA et al, 2000) e pela presença de linfócitos fetais na circulação da mãe (RUDEK e KWIATKOWSKA, 1983).

Os efeitos do vírus sobre o embrião estão diretamente relacionados à fase de gestação em que a fêmea se encontra (ANTONIS et al, 2006). Na fase de pré-fixação dos

blastocistos, de 0 a 9 dias após a concepção, a infecção poderá ter como consequência a mortalidade destes. Se a mortalidade for grande, resultando na sobrevivência de menos de quatro blastocistos, a gestação não é reconhecida pelo organismo materno, sendo todos eles reabsorvidos e ocasionando, clinicamente, o retorno ao cio cíclico. Se sobreviverem mais de quatro blastocistos, a gestação é reconhecida e prosseguirá normalmente, tendo como consequência o nascimento de leitegadas pequenas. Ao ingressar no estágio de embrião, se a infecção ocorrer entre o 10º e o 35º dia de gestação, poderá ocorrer a reabsorção dos embriões, sendo total, caso ocorra a morte de todos, com retorno ao cio acíclico, ou parcial, quando alguns sobrevivem, com consequente nascimento de leitegadas pequenas. Após o 35º dia de gestação, durante a fase fetal, inicia-se a ossificação do feto, sendo que, se infecção com o PVS ocasionar a morte, não haverá mais a possibilidade de reabsorção, impossibilitada pela presença do esqueleto. Com isto, se todos os fetos morrerem, os tecidos moles serão reabsorvidos restando apenas os fetos mumificados e ocasionando anestro e esterilidade da fêmea. A gestação prossegue se alguns sobreviverem, resultando na expulsão de animais normais, natimortos e fetos mumificados de diferentes tamanhos durante o processo do parto. Deve se salientar que quando a infecção ocorre após os 70 dias de gestação, quando o feto já alcançou a imunocompetência, o próprio sistema imune fetal poderá debelar essa infecção pela produção de anticorpos próprios, tendo como consequência o nascimento de leitões soropositivos (JOO et al, 1976b; MENGELING e CUTLIP, 1976; MENGELING et al, 2000).

A sorologia é considerada o melhor método de diagnóstico do PVS, devido às dificuldades relacionadas à detecção e ao isolamento viral. Desde a descoberta da

capacidade dos parvovírus em aglutinar hemácias (BRAILOVSKY, 1966), a técnica de inibição da hemoaglutinação (HI), padronizada alguns anos depois, é considerada o método ouro para detecção de anticorpos contra o PVS (JOO et al, 1977). Outros métodos como o ELISA (HOHDATSU et al, 1988; WESTENBRINK et al, 1989), a microaglutinação em tubo (JOO et al, 1975), a imunodifusão em gel de ágar (TOO et al, 1983), a imunofluorescência (RIVERA et al, 1986) e a aglutinação rápida em placa (LÜ et al, 2006) foram desenvolvidos para o diagnóstico de PVS, entretanto nenhuma técnica conseguiu obter a praticidade e confiança da HI para o PVS.

2.1.2. Etiologia

Os parvovírus compõem a família Parvoviridae que, por sua vez é dividida em duas subfamílias: (1) a Parvovirinae, que infecta vertebrados e (2) a Densovirinae, que infecta insetos (ICTV, 2009). A subfamília Parvovirinae é composta de cinco gêneros: *Parvovirus*, *Erythrovirus*, *Dependovirus*, *Amdovirus* e *Bocavirus*. O gênero *Parvovirus* é composto de doze espécies, incluindo o parvovírus suíno, todas antigenicamente distintas, tendo sua infecção natural restrita a um único hospedeiro (ICTV, 2009). Os membros da família *Parvoviridae* estão entre os menores vírus de DNA que infectam animais, sendo seu tamanho variável entre 18 e 26nm dentro das espécies (SIEGL et al, 1985). São vírus aproximadamente esféricos, com simetria icosaédrica e desprovidos de envelope.

O parvovírus suíno tem cerca de 20nm (CHAPMAN e ROSSMAN, 1993) e sua massa molecular é de 5,5 a 6,2 x 10⁶, com aproximadamente metade de sua massa em proteína e a outra metade em DNA (HORWITZ et al, 1996). Ele é constituído por DNA linear de fita simples e sua

extensão é de 5075 nucleotídeos (GenBank L23427). Possui duas extensas janelas de leitura (ORF) que não se sobrepõem (Fig. 1), uma contendo o promotor PT4, responsável pela codificação das proteínas não estruturais NS-1, NS-2 e NS-3, e a outra o promotor PT40, codificador das proteínas de capsídeo VP-1 e VP-2 (BERGERON et al, 1993). VP-1 e VP-2 são produtos de diferentes *splicing* do gene PT40 (CASAL, 1996). A proteína do capsídeo VP-3 é formada após uma clivagem pós traducional da VP-2 (PARADISO, 1981). Já as proteínas NS-2 e NS-3 são codificadas através de diferentes *splicing* do gene que codifica a NS-1 (BERGERON et al, 1993). As proteínas não estruturais NS-1, NS-2 e NS-3 estão

ligadas à replicação viral, sendo a NS-1 importante também no processo de empacotamento das partículas virais (NUESCH et al, 1995), além de poder se ligar às proteínas da célula hospedeira, induzir lise celular e apoptose (RAYET et al, 1998; DAEFFLER et al, 2003).

Nas extremidades 3' e 5' do genoma viral encontram-se seqüências palindrômicas que formam estruturas em forma de "T" e "Y" (BERNS e HAUSWIRTH, 1983; SHADE et al, 1986). Estas estruturas parecem ter a função de manter a integridade da porção terminal do genoma, além de funcionar como iniciadores, onde a DNA polimerase se liga durante a replicação viral.

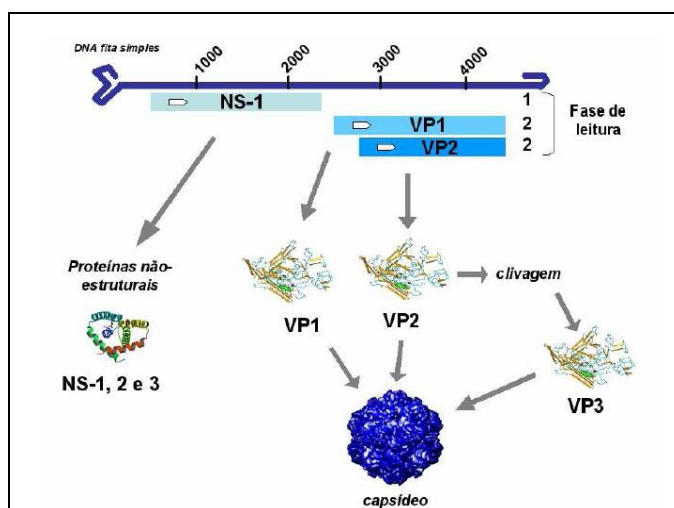


Figura 1- Representação esquemática da estrutura do genoma do PVS, com a localização das regiões que codificam as proteínas estruturais e não estruturais (STRECK, 2009). As duas janelas de leitura estão representadas em azul claro. A fase de leitura 1 é responsável pela codificação das proteínas não estruturais NS-1, NS-2 e NS-3 através de diferentes *splicing* do gene da NS-1. A fase de leitura 2 é responsável pela codificação das proteínas VP-1 e VP-2 através de diferentes *splicing* do gene da VP-1. Já a VP-3 é produzida após clivagem pós traducional da proteína VP-2.

Também foi demonstrada a existência de outras duas janelas de leitura no genoma do PVS. Elas são pequenas e estão situadas em

diferentes posições do genoma, inclusive sobrepostas às outras duas grandes ORF (AMAND et al, 1991). ZADORI e colaboradores (2005) descreveram uma

proteína fundamental para replicação do PVS que também utilizava o promotor PT40.

2.1.3. Estrutura e organização do genoma viral

O capsídeo do parvovírus é formado a partir do rearranjo das proteínas estruturais VP-1, VP-2 e VP-3. Estas estão repetidas em mais de 60 cópias formando uma partícula quase esférica, de simetria icosaédrica (CHAPMANN e ROSSMANN, 1993). Cada uma destas cópias é composta pelo grupo de aminoácidos comum à parte carboxi-terminal da VP-2 (TSAO et al.,

1991), sendo que somente a porção N-terminal da VP-1 está ausente no capsídeo (XIE e CHAPMAN, 1996). A proteína VP-1 tem 83 kDa de tamanho, enquanto a VP-2 tem 64kDa e a VP-3 tem 61kDa (SAKURAI et al, 1989; HORWITZ et al, 1996).

Os parvovírus apresentam em sua superfície, estruturas que consistem em pequenas protuberâncias (*spikes*) na porção 3-fold, além de depressões (*dimples*) na porção 2-fold e cilindros circundados de depressões (*canyons*) na porção 5-fold (TSAO et al, 1991), como demonstrado na Fig. 2.

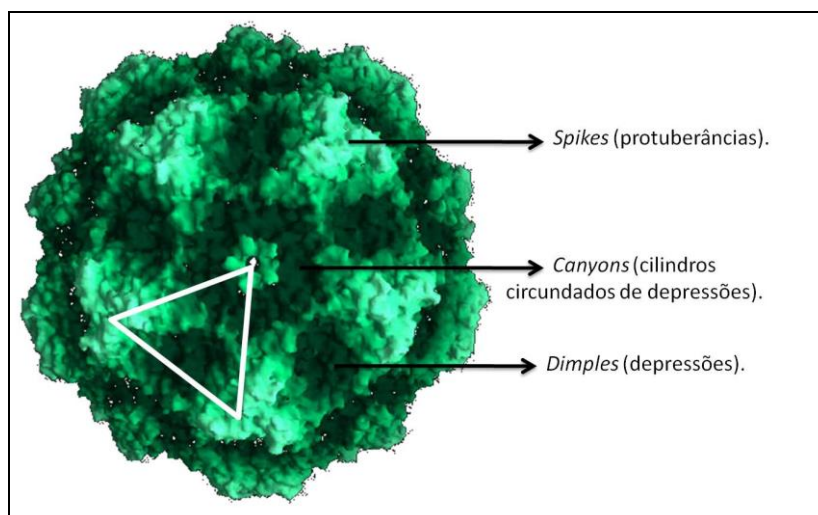


Figura 2- Visualização esquemática do *Parvovírus* (adaptação de TSAO et al, 1991), mostrando as estruturas presentes na superfície viral. O triângulo representa uma das 60 subunidades repetitivas que compõem o capsídeo viral completo. Cada subunidade é composta de dois *spikes* (porção 3-fold), um *canyon* (porção 5-fold) e um *dimple* (porção 2-fold).

A superfície externa dos parvovírus apresenta uma grande porção hidrofóbica e a presença dessa região hidrofóbica pode explicar a propensão das proteínas a se agruparem e formarem o capsídeo (XIE e CHAPMAN, 1996). Esta pode ser também a explicação para a automontagem de proteínas VP-2 produzidas isoladamente, que sozinhas são capazes de formar um

capsídeo completo, mesmo sem a presença das outras proteínas estruturais e do ácido nucleico (MARTINEZ et al, 1992). Estas partículas virais desprovidas de material genético são chamadas de “partículas semelhantes a vírus” ou pseudopartículas, conhecidas pela comunidade científica internacional por “virus like particles” ou VLP.

As VLP do PVS, semelhantemente aos virions naturais, são muito estáveis em condições ambientais extremas e descobriu-se que elas podem ser altamente imunogênicas quando inoculadas como vacinas (SEDLIK et al, 1995). Estudos demonstraram que as VLP, diferentemente da vacina inativada, são capazes de estimular uma resposta imune do tipo celular, que é uma das respostas estimulada quando se tem a infecção natural pela partícula viral ativa (SEDLIK et al, 1997).

Além da proteína VP-2 ser a proteína estrutural mais abundante nos parvovírus, constituindo cerca de 90-95% da partícula viral (os outros 5-10% são VP-1, segundo CASAL, 1999), outro fator envolvido diretamente no processo de automontagem do capsídeo diz respeito a uma sequência de aminoácidos da porção N-terminal da VP-2, susceptível à clivagem por proteases. É descrito que esta região, após a ação de proteases, origina a proteína VP-3. Estas características fornecem à VP-2 a capacidade de formar partículas estruturalmente e imunologicamente muito semelhantes ao capsídeo infectante e a base para automontagem destes capsídeos são estruturas formadas por trímeros da proteína VP-2 (RUEDA et al, 2000). A importante característica que difere uma “partícula semelhante a vírus” de uma partícula viral completa é a falta de capacidade replicativa dentro de uma célula hospedeira devido à ausência do ácido nucléico viral (CASAL, 1999).

2.1.4. Resposta imune

2.1.4.1. Ao VLP do PVS

Partículas virais inativadas do PVS, quando inoculadas em um animal, são consideradas como antígeno exógeno e são internalizadas por células apresentadoras de antígenos (CAA), sendo degradadas dentro de

vesículas lisossomais de pH extremamente baixo. Com isso, os peptídeos gerados são então ligados ao complexo principal de histocompatibilidade do tipo II (MHC de classe II), os quais são apresentados na superfície celular às células T auxiliares CD4⁺, diretamente relacionadas à resposta imune direcionada à produção de anticorpos. Quando se inocula uma VLP, este antígeno é considerado endógeno, já que sua entrada na célula ocorre via receptor. A VLP alcança o citoplasma celular, escapando das vesículas lisossômicas. A degradação dessas proteínas ocorre via proteossomo. Os peptídeos gerados são enviados ao retículo endoplasmático e lá são associados ao MHC de classe I. Esses complexos contendo o peptídeo mais o MHC de classe I são então transportados até a superfície celular e apresentados às células T CD8⁺, que são linfócitos citotóxicos, ligados diretamente a uma resposta imune do tipo celular (SEDLIK et al, 2000). Com isso, quando se utiliza a VLP como imunógeno, em substituição à partícula viral inativada, consegue-se estabelecer uma resposta imune mais próxima da resposta estimulada pelo vírus em uma infecção natural.

2.1.4.2. Na parvovirose suína:

A primeira defesa que o sistema imune utiliza contra o PVS são as barreiras físicas e químicas dos tratos respiratório e gastrointestinal, como a barreira microbiana, o fluxo de muco, a presença de uma série de enzimas e o pH extremamente ácido, que agem inibindo a instalação viral no organismo (TIZARD, 2009). Entretanto, o PVS é capaz de suportar alterações bruscas de temperatura e pH (CARTWRIGHT et al, 1969; MENGELING, 1972), ultrapassando com facilidade estas barreiras, possivelmente por apresentar um capsídeo simples e compacto (CHAPMANN e ROSSMANN, 1993).

Com isso, como o PVS consegue chegar aos tecidos e ao sangue, a estratégia de defesa do organismo que é mais eficaz contra esta doença é o desenvolvimento de anticorpos específicos contra o vírus, sendo que todas as infecções causadas por parvovírus são principalmente controladas por resposta de anticorpos, diferentemente do que acontece com outros vírus (CASAL, 1996). A presença de IgA contra PVS inibe sua entrada via mucosas e altos níveis IgG asseguram a proteção do animal contra o desenvolvimento da doença. A VP-2, que é a proteína estrutural localizada mais externamente no capsídeo viral, é o principal alvo dos anticorpos neutralizantes contra o parvovírus suíno (LOBATO, 1990).

A imunidade ativa é associada a altos títulos de anticorpos contra PVS (≥ 256 UHA, segundo JOHNSON et al, 1976). Este título de anticorpos pós infecção, além de alto é duradouro. Já a imunidade adquirida via vacinação raramente excede esse título utilizando a inibição da hemoaglutinação como teste diagnóstico segundo ORAVAINEN e colaboradores (2006).

O vírus é raramente isolado de leitões, que são considerados imunes por causa do alto título de anticorpos protetores adquiridos pelo colostro (MENGELING et al, 2000). A duração da imunidade passiva é de quatro a seis meses (PAUL et al, 1980). Após a infecção natural dos suínos com o PVS, o animal estará imune durante toda sua vida contra a doença clínica (ANTONIS et al, 2006), provavelmente pelo efeito *booster* causado pelas repetidas exposições virais a que o animal fica exposto durante toda a vida (MENGELING et al, 2000).

2.1.5. Controle

A vacinação é a principal medida de controle contra a parvovirose suína, cujo

objetivo é estimular a imunidade do plantel, evitando a infecção dos embriões e fetos (ROEHE et al, 2007). Além disso, medidas de manejo dirigidas a promover um bom *status* sanitário do rebanho devem ser adotadas (MENGELING, 1999; ROEHE et al, 2007).

Outra técnica utilizada no controle da parvovirose suína é conhecida como retroinfecção. Ela consiste em estabelecer uma infecção natural em leitões antes da primeira cobertura, através do contato direto delas com porcas do plantel ou pela exposição a restos placentários, fetos mumificados e fezes de porcas acometidas com a doença. Esta técnica está deixando de ser utilizada por apresentar alto risco de disseminação de outras doenças, reprodutivas ou não, além de nem sempre ser confiável, já que não se tem garantia que os excrementos apresentados às leitões possuam realmente o PVS ou que, caso possuam, as leitões sejam realmente infectadas por ele (LOBATO, 1990; ROEHE, 2007).

Atualmente, as vacinas disponíveis no mercado nacional contra o PVS são produzidas pelo crescimento do vírus em cultivo de células de suíno. Após titulação viral, esse vírus é inativado por agentes químicos como a formalina ou a β -propiolactona. Esses processos são caros, trabalhosos e envolvem risco por necessitar do crescimento e manipulação de grandes quantidades de vírus infecciosos. Além disso, há a limitação prática da produção viral, já que o PVS tem lenta replicação *in vitro* (ANTONIS et al 2006) e que, após cada passagem, tem seu título reduzido, resultante da produção e acúmulo de partículas defectivas. A dificuldade em se produzir a vacina inativada em laboratório e industrialmente justifica o desenvolvimento de vacinas alternativas contra o PVS, como as vacinas recombinantes de subunidades.

2.2. Adjuvantes

2.2.1. Introdução

Adjuvantes são usados para melhorar a resposta imune da vacina de diversas maneiras: aumentando a imunogenicidade de antígenos fracos; aumentando a velocidade e duração da resposta imune; modulando a avidéz, especificidade, isotipos ou distribuição de subclasses de anticorpos; induzindo uma imunidade de mucosas; aumentando a resposta de indivíduos imaturos ou diminuindo a dose de antígeno utilizada nas vacinas, diminuindo custos. Segundo JANEWAY e colaboradores (2007), um adjuvante pode ser definido como uma substância que aumenta a resposta imune específica de um animal a um antígeno, sendo qualquer substância que aumente a imunogenicidade de outras substâncias que com ela são injetadas em um organismo. Eles diferem das proteínas carreadoras por não formarem ligações estáveis com o imunógeno.

As vacinas podem ser constituídas tanto de patógenos atenuados, quanto de patógenos inativados. Hoje, também são empregadas vacinas contendo somente alguns peptídeos destes patógenos. Dentre estas, as vacinas vivas atenuadas são as que estimulam mais eficientemente a resposta imune por serem capazes de multiplicar dentro do organismo (STEPHEN, 2000). Como as vacinas inativadas e de peptídeos não são capazes de multiplicar dentro do organismo, adjuvantes são incorporados a essas na tentativa de melhorar sua antigenicidade e imunogenicidade.

A escolha de um adjuvante é afetada pelo tipo de resposta imune desejada, a espécie animal a ser imunizada, a rota de administração da vacina e a tolerância dos animais aos possíveis efeitos adversos destes adjuvantes. Classes de adjuvantes incluem os derivados de alumínio, os derivados bacterianos, agentes tensoativos,

veículos e sistemas de lenta liberação (ALLISON e BYARS, 1994). Geralmente eles são classificados em particulados, os quais apresentam partículas microscópicas nas quais o imunógeno está incorporado ou associado, e não particulados, os quais geralmente são imunomoduladores que aumentam a resposta imune e podem ser associados aos primeiros. Entre os particulados estão os derivados de alumínio, as emulsões do tipo água em óleo, emulsões do tipo óleo em água e as emulsões múltiplas, além dos lipossomas e das micro e nanopartículas. Entre os não particulados, destacam-se o muramil-dipeptídeo (MDP), as saponinas, as citocinas e as toxinas bacterianas (COX e COULTER, 1997). Deste modo, os adjuvantes podem aumentar a imunogenicidade de duas formas distintas: primeiro, eles convertem antígenos protéicos solúveis em material particulado, facilmente fagocitado pelas células apresentadoras de antígeno, como os macrófagos (ex: alúmen). O antígeno pode ser particulado por emulsificação em óleos minerais ou incorporados em partículas coloidais de complexos imunomoduladores (ISCOMs). Segundo, pela associação de bactérias ou de componentes de bactérias. O produto microbiano pode sinalizar para que os macrófagos ou células dendríticas se tornem células apresentadoras de antígeno efetivas. Um dos seus efeitos é induzir a produção de citocinas inflamatórias e potentes respostas inflamatórias locais; tal efeito provavelmente é intrínseco à sua ação em aumentar as respostas, mas impossibilita seu uso em humanos (JANEWAY et al ; 2007).

Hidróxido de alumínio é o adjuvante mais comumente usado entre os derivados de alumínio e o mais escolhido quando se deseja uma resposta imune humoral. O alumínio induz uma resposta imune celular relativamente baixa. Por outro lado, o adjuvante completo de Freund (ACF) contém bactérias mortas (*Mycobacterium*)

sendo capaz de induzir tanto a resposta celular quanto a resposta humoral. Este adjuvante é considerado o melhor dos adjuvantes contendo derivados bacterianos. Entretanto, está proibido na maioria dos países por causar reações graves no local de sua aplicação. Já no adjuvante incompleto de Freund (AIF), essas bactérias estão ausentes, induzindo somente respostas de anticorpos. O componente ativo do *Mycobacterium* é o N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamina, comumente descrito como MDP. Análogos do MDP foram desenvolvidos e testados. Novos veículos foram desenvolvidos como o *syntex adjuvant formulation* (SAF) na tentativa de se eliminar alguns dos problemas associados com a inoculação de ACF e AIF. Essa formulação foi utilizada com sucesso adicionada de threonyl-MDP, como um adjuvante para uma variedade de antígenos, resultando em uma forte resposta imune, tanto humoral quanto celular (ALLISON e BYARS, 1994).

Indução deliberada de uma resposta imune é conhecida como imunização. A via, a dose e a forma pela qual um antígeno é administrado podem afetar a própria ocorrência da resposta e o tipo de resposta que é produzido. Antígenos injetados no tecido subcutâneo geralmente provocam uma forte resposta, provavelmente porque são capturados pelas células de Langherans e apresentados eficientemente aos linfonodos locais. Antígenos injetados ou transfundidos diretamente na circulação tendem a não induzir resposta imune ou induzem tolerância, a não ser que se liguem às células do hospedeiro ou estejam na forma de agregados que serão facilmente capturados pelas CAA. Doses baixas de antígeno não são boas estimuladoras do sistema imune (tolerância de zona baixa). Quando a dose é muito alta, a resposta imune também é inibida (tolerância de zona alta) o que pode ser importante para manutenção da tolerância às proteínas do

próprio organismo, como as proteínas plasmáticas.

Os mecanismos de ação pelos quais os adjuvantes aumentam a resposta imune não são totalmente elucidados. Adjuvantes podem atuar de várias formas (ROITT, BROSTOFF e MALE, 1996; COX e COULTER, 1997; JANEWAY et al, 2007; ABBAS, LICHTMAN e POBER, 2000), sendo estas:

- **Imunomodulação:** refere-se à habilidade de muitos adjuvantes em modificar a produção de citocinas. Geralmente induz ao aumento da produção de algumas citocinas enquanto reduz, concomitantemente, a produção de outras. Os dois principais tipos de células T CD4+, denominadas Th1 e Th2, são capazes de induzir dois tipos antagônicos de resposta. A resposta Th1 induz a fortes reações de hipersensibilidade e são associadas com a produção de IFN- γ , IL-2 e IL-12, atuando principalmente em infecções virais por estar mais relacionada a uma resposta mais celular, enquanto que a resposta conhecida como Th2 resulta em alta secreção de anticorpos circulatórios e secretórios, frequentemente IgE, além de estimular a secreção de citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e possivelmente IL-10, resultando em uma resposta mais humoral. Respostas Th1 e Th2 são mutuamente inibitórias (Fig. 3). A seleção correta de um adjuvante imunomodulador, apropriado ao tipo de resposta que se quer estimular ao realizar a imunização, deve ser realizada, lembrando que nunca a resposta irá ser totalmente celular, nem totalmente humoral. As citocinas IL1, IL2 e INF- γ têm sido testados por sua atividade

adjuvante. Entretanto, a aplicação prática de citocinas como adjuvantes apresenta muitas dificuldades. Por exemplo, múltiplas doses seriam provavelmente necessárias, além de a própria citocina atuar como um antígeno. Entretanto, escolhendo o adjuvante apropriado, a síntese específica de um grupo de citocinas pode ser estimulada. Isto pode aumentar a síntese de isotipos de anticorpos específicos. $\text{INF-}\gamma$ aumenta a produção de IgG2a em camundongos, enquanto IL-4

aumenta a síntese de IgG1 e IgE. Respostas mediadas por células T a antígenos resultam em liberação de $\text{INF-}\gamma$. Então adjuvantes como ACF e SAF/MDP, que aumentam a imunidade celular, favorecem a formação de anticorpos do tipo IgG2a. Alumínio e Quil A, que são fracos estimuladores de respostas de células T, induzem anticorpos do tipo IgG1 e IgE, provavelmente por estimular uma maior liberação de IL-4 do que $\text{INF-}\gamma$.

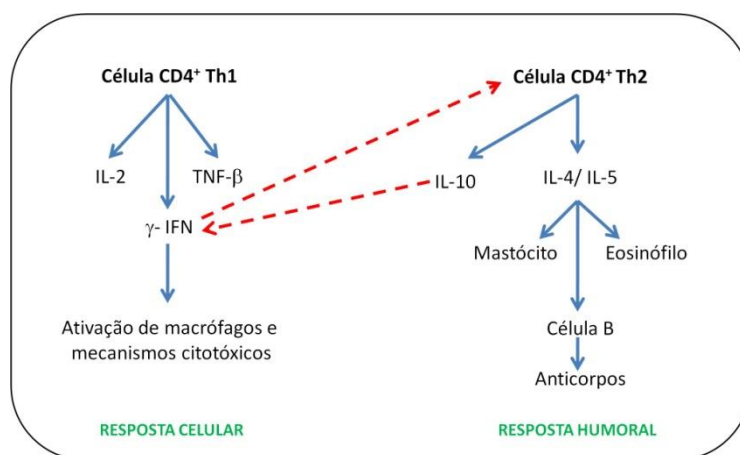


Figura 3- Esquema do efeito da inibição mútua entre as respostas Th1 e Th2, mostrando o efeito estimulatório (setas azuis contínuas) e inibitório (setas vermelhas pontilhadas) de algumas citocinas sobre a produção de outras citocinas e sobre a própria proliferação celular (adaptação de COX e COULTER, 1997 e ROITT, BROSTOFF e MALE, 1996).

- **Apresentação antigênica:** se refere à habilidade de um adjuvante em preservar a integridade conformacional de um antígeno e apresentá-lo às células imunes efectoras apropriadas, aumentando a resposta de anticorpos neutralizantes. O modo como o antígeno é apresentado, ligado ao MHC de classe I ou ao MHC de classe II, também pode influenciar a duração da resposta imune. A

apresentação de antígenos pode ser aumentada através de um aumento da infiltração celular dentro do sítio de inoculação causada pelo adjuvante ou por este promover diretamente a captação de antígenos pelas células apresentadoras de antígenos, podendo também contribuir diretamente para a apresentação de antígenos em linfonodos locais.

- **Indução da resposta de células T citotóxicas CD8⁺:** a indução de uma resposta de CTL requer que o antígeno seja processado no citoplasma celular (via endógena), onde este seja apresentado na superfície celular ligado ao MHC do tipo I. Para um adjuvante induzir uma resposta de CTL, ele deverá facilitar a incorporação ou persistência do peptídeo ao MHC do tipo I.
- **Ativação do sistema complemento:** adjuvantes podem servir de alvo para células apresentadoras de antígeno como as células de Langerhans, células dendríticas e células B. As células B apresentam antígenos a células T eficientemente. Células dendríticas expressam receptores de alta afinidade para o componente C3 do sistema complemento ativado. Estes adjuvantes não modificam o tipo de resposta imune, mas afetam consideravelmente a quantidade de antígeno requerida para o desenvolvimento desta resposta. Alguns adjuvantes podem facilitar a localização para as células dendríticas pela ativação do complemento. Isto se aplica para adjuvantes como SAF/MDP, o LPS e algumas composições com lipossomas. Na resposta imune secundária, o sistema complemento é ativado como resultado da formação do complexo antígeno-anticorpo.
- **Geração de depósito no local da aplicação:** alguns adjuvantes como o ACF, AIF e o alumínio são responsáveis pela lenta liberação do antígeno por formar um depósito no local da aplicação. Adjuvantes que só agem fisicamente como matriz, cuja função é tão somente a formação de depósito, são

chamados de adjuvantes veículos. Pode ser um depósito de curto ou longo prazo, além de poder ser de liberação contínua ou pulsátil. Depósito por curto prazo são feitos quando utilizamos como adjuvante os derivados de alumínio e a emulsão água em óleo, onde o antígeno fica retido no local da inoculação e, assim ficando livre da degradação pelo fígado. Depósito de longo prazo pode ser feito utilizando polímeros sintéticos na produção de microesferas, como as de quitosana, que podem ter liberação contínua pela degradação de sua partícula.

A principal limitação dos adjuvantes é que não há um adjuvante universal. Alguns adjuvantes estimulam tanto a resposta humoral quanto a celular, enquanto que outros aumentam primariamente a síntese de anticorpos. A resposta a alguns antígenos é efetivamente aumentada com alguns adjuvantes, enquanto a resposta a outros antígenos com este mesmo adjuvante pode não aumentar. Por exemplo, resposta humoral para o antígeno da influenza não aumenta significativamente pela adição de alumínio; a vacina contra *Tripanossomo sp* em saponina protege camundongos desafiados com o tripanossomo vivo, enquanto a maioria dos adjuvantes é ineficaz.

Carboidratos são geralmente antígenos mais fracos que as proteínas, sendo que o estudo de adjuvantes para antígenos de carboidratos é mais difícil que para um antígeno proteico ou glicoproteico. Pequenos peptídeos também são considerados antígenos fracos e geralmente necessitam se ligar a uma proteína carreadora. Sendo assim, diversos adjuvantes contra determinado antígeno deverão ser testados para selecionar o que

levará a melhor resposta imune (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2012).

Efeitos adversos indesejáveis também poderão ser uma importante limitação do uso de adjuvantes. ACF pode induzir a formação de granulomas no local da inoculação, além de fazer com que o animal inoculado se torne sensível à tuberculina (ALLISON e BYARS, 1994). Por essa razão não se deve fazer uso de ACF em vacinações secundárias, devendo-se utilizar AIC em imunizações subsequentes. Adjuvantes podem ser pirogênicos, tendo como exemplo o LPS; ou induzirem a inflamação, tendo como exemplo as saponinas. Algumas características físicas dos adjuvantes podem ser negativas na hora de formular uma vacina. Um exemplo é avridine, que é insolúvel em soluções aquosas, podendo somente ser usado como suspensão nessas soluções ou somente em veículos oleosos (ALISSON e BYARS, 1994).

2.2.2. Adjuvantes à base de hidróxido de alumínio

Os derivados de alumínio são amplamente utilizados como adjuvantes em vacinas humanas e veterinárias desde a década de 30, mostrando excelentes resultados, além de baratos, seguros e simples de formular. São utilizados na forma de gel de hidróxido de alumínio com partículas que vão de 100 a 1000nm de tamanho. Eles induzem uma forte resposta do tipo Th2 e boa apresentação antigênica quando algum imunógeno está adsorvido, sendo o antígeno ligado por interações eletrostáticas ao gel pré-formado ou durante a formação do gel *in situ*. Entretanto, tem como desvantagem a não indução de resposta imune do tipo celular. Fortes resposta de IgE são frequentemente reportadas quanto se utiliza este adjuvante (COX e COULTER, 1997).

2.2.3. Emulsões tipo óleo/água

As emulsões do tipo óleo em água caracterizam-se por microgotículas de óleo estabilizada por surfactantes em uma fase aquosa contínua. Resulta em uma excelente apresentação antigênica (COX e COUTER, 1997), liberação lenta de antígenos e promovem uma estimulação duradoura do sistema imune (BOMFORD, 1997). O Emulsigen® (MVP Technologies), utilizado como adjuvante comercial neste experimento é uma emulsão do tipo óleo em água, sendo a sua completa constituição considerada segredo industrial. Ele é liberado pelo Ministério da Agricultura Americano (USDA) para uso em vacinas veterinárias. É de fácil preparo por envolver apenas uma etapa de emulsificação.

O mecanismo de ação das emulsões óleo em água é decorrente da formação de depósito no local da aplicação propiciando uma liberação lenta do antígeno. Induzem a boa resposta de anticorpos, especialmente quando o antígeno for hidrofóbico (COX e COULTER, 1997). Estas emulsões apresentam como vantagens a alta segurança e baixo custo, sendo excelentes veículos para preparação de vacinas, sendo sua segurança explicada pela baixa porcentagem de fase oleosa utilizada, situada entre 15 e 25% (AUCOUTURIER et al, 2001). Como desvantagens, não são capazes de alterar a ação de citocinas (imunomodulação fraca) e as emulsões podem ser instáveis.

2.2.4. Emulsões múltiplas

As emulsões múltiplas são emulsões de emulsões (emulsão água em óleo dispersa em uma segunda fase aquosa) em que uma fase dispersa engloba outra fase dispersa, possibilitando a liberação prolongada das substâncias encapsuladas, pois o antígeno na fase aquosa externa é liberado imediatamente ao sistema imune como nas

vacinas aquosas, enquanto que o antígeno contido na fase aquosa interna será liberado lentamente como nas emulsões do tipo água/óleo (CUNHA, GROSSIORD E SEILLER, 1998). A fase mais interna aquosa é separada da outra fase aquosa externa por uma fase intermediária oleosa

(representação esquemática Fig. 4). Elas apresentam em sua fase interna uma emulsão água em óleo e uma fase aquosa como fase contínua (HORZINEK et al, 1997).

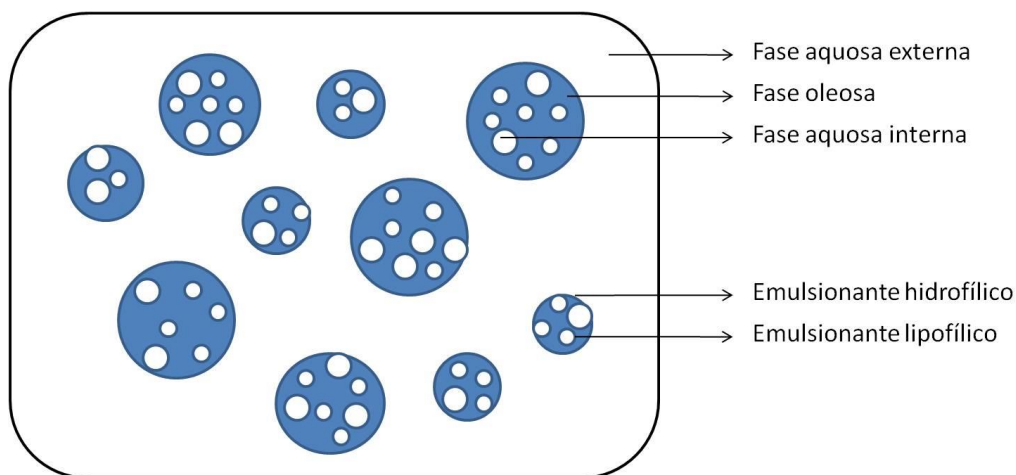


Figura 4- Representação esquemática de uma emulsão múltipla, demonstrando a fase aquosa externa englobando uma fase interna composta de uma emulsão água em óleo.

Devido à estrutura que apresentam, as emulsões múltiplas possuem propriedades muito interessantes como veículo de fármacos e antígenos. Elas permitem a proteção de fármacos encapsulados, a separação de substâncias incompatíveis, elevada capacidade de encapsulamento de substâncias quando comparadas com outros sistemas, além da possibilidade de controle da liberação dessas substâncias encapsuladas (CUNHA e GONTIJO, 2000).

2.2.5. Microemulsões

Microemulsões são dispersões de água em óleo, termodinamicamente estáveis, pouco viscosas, transparentes e opticamente isotrópicas, geralmente estabilizadas por

um emulsionante e um co-emulsionante (Fig. 5). Tem como vantagens a solubilização de antígenos hidrofílicos e lipofílicos, melhoria na estabilidade, além da liberação prolongada dos mesmos (GASCO, 1997). Além disso, YANG e colaboradores (2004) relacionaram a atividade adjuvante da microemulsão ao fato dos emulsionantes utilizados, entre eles o Tween 80, promoverem apoptose e necrose celular e desta forma, por meio da fagocitose destas células, promoverem a apresentação cruzada de antígenos via MHC de classe I.

A substituição do uso de emulsões simples pela microemulsão está sendo estimulada, principalmente pelas vantagens descritas sucintamente no quadro 1.

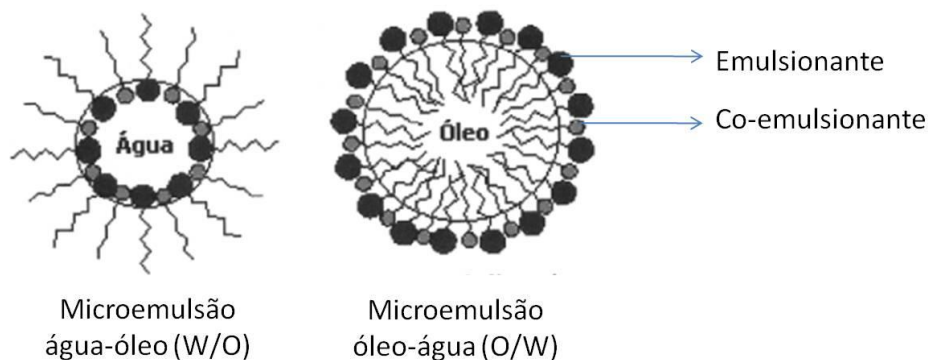


Figura 5- Representação esquemática da estrutura das microemulsões (adaptado de OLIVEIRA et al, 2004), onde a micela é formada com o uso de um emulsionante e é estabilizada com o uso de um co-emulsionante.

Quadro 1- Comparação entre a emulsão simples e a microemulsão (adaptado de LAWRENCE e REES, 2000):

EMULSÃO SIMPLES	MICROEMULSÃO
Termodinamicamente instável e eventualmente se separa em fases	Exibe excelente estabilidade cinética
Tem o aspecto leitoso; turva	Límpida e transparente
Altamente viscosa	Fluida
Baixa seringabilidade	Alta seringabilidade
Requer grande quantidade de energia para sua preparação	Não requer grande quantidade de energia para sua preparação

2.2.6. Microesferas e implantes de quitosana

Originárias de aminopolissacarídeos biodegradáveis e biocompatíveis, as microesferas e os implantes de quitosana encapsulam antígenos em seu interior através de seu sistema de poros, promovendo alteração na cinética de liberação dos mesmos e promovendo a estimulação de macrófagos e linfócitos T citotóxicos e produção de citocinas, principalmente IL-1 (SILVA, SANTOS E FERREIRA, 2006). A quitosana é hidrofílica, não é tóxica e é biocompatível, obtida através da desacetilação alcalina da quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, obtido do

exosqueleto de crustáceos e outros animais marinhos (ALPAR e GROVES, 2006). A biodegradação da quitosana por lisozimas resulta na liberação de aminoaçúcares, que são incorporados às vias metabólicas da glicosaminoglicana e glicoproteína, ou são excretados (CHATELET et al, 2001).

Devido à sua natureza policatiónica, quando a quitosana entra em contato com soluções ácidas é possível sua moldabilidade nas mais diversas formas como membranas, gel, esferas, microesferas e implantes. Outra característica importante está na possibilidade de modificações estruturais de modo a obter diversas formas de interação química e resistência mecânica (SENEL e MCCLURE, 2004).

3. OBJETIVO

3.1. Geral

Desenvolver e avaliar adjuvantes não convencionais em formulações de vacinas inativadas e de subunidades utilizando o parvovírus suíno como modelo.

3.2. Específicos

- Desenvolver e formular os adjuvantes:
 - Emulsão múltipla
 - Microemulsão
 - Microesferas de quitosana
 - Implantes de quitosana
- Produzir vacinas inativadas contendo os adjuvantes formulados.
- Produzir “partículas semelhantes a vírus” pela clonagem do gene VP-2 do Parvovírus suíno em sistema baculovírus.
- Produzir vacinas de subunidades (VLP) contendo os adjuvantes formulados.
- Avaliar a resposta imune humoral gerada pelas diversas formulações de vacinas (inativadas e VLP) para parvovírus suíno em cobaias (modelo de referência) e comparar com vacina aquosa comercial.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Locais de realização do experimento:

- Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal- Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG.
- Laboratório de Farmacotécnica- Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da UFMG.
- Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia-

Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da UnB.

- Laboratório de Materiais de Referência- LANAGRO/ MAPA-MG.
- Laboratório de soros e vacinas da Escola de Veterinária da UFMG.

4.2. Cultivo celular e obtenção do antígeno

4.2.1. Suspensão viral

Foi utilizada a amostra de referência do parvovírus suíno PPV NADL-2 biotipo citopatogênico (ATCC VR-742™; MENGELING, 1972).

4.2.2. Células

A amostra de parvovírus suíno foi mantida em culturas de células ST que são células de testículo de feto de suíno aos 80 dias de gestação (ATCC CRL-1746™; MCCLURKIN e NORMAN, 1966). As amostras foram inoculadas em monocamadas 60% confluentes cultivadas em meio MEM com 2u/ml de penicilina G potássica, 2µg/ml de sulfato de estreptomicina, acrescidos de 10% de soro fetal bovino. As culturas inoculadas foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C até que se observasse 85-90% de efeito citopático, o que ocorria entre 72 e 96 horas pós inoculação. Alguns efeitos observados foram lise celular, inclusões intranucleares, arredondamento celular, vacúolos citoplasmáticos, núcleos picnóticos, além de uma diminuição na velocidade de divisão da célula. As garrafas de cultivo foram então congeladas e descongeladas três vezes com o objetivo de romper as células que estivessem íntegras, liberando o vírus que estivesse retido dentro delas. Após o último descongelamento, a suspensão viral foi clarificada por centrifugação a 3000g por 15 minutos. O precipitado contendo restos celulares foi

descartado e a suspensão viral foi alíquotada em criotubo e estocada a -80°C até sua titulação e uso.

4.2.3. Titulação viral

Todas as suspensões virais produzidas foram tituladas utilizando a técnica de hemoaglutinação em placas de fundo V, utilizando hemácias de cobaia, segundo JOO, DONALDSON-WOOD e JOHNSON (1976a). A titulação foi expressa em título hemaglutinante, que é a recíproca da maior diluição do vírus capaz de causar hemaglutinação completa. Foram selecionadas as suspensões que possuíam títulos de 1024 UHA para produção das vacinas.

4.2.4. Inativação viral

Para inativação viral adicionou-se β -propiolactona (BPL) na concentração final de 0,2% à suspensão viral, que foi mantida sob agitação por duas horas a 37°C e por mais quatro horas à 25°C, sendo o pH ajustado para 7,2 com K_2PO_4 a 1M, sempre que necessário (JOO e JOHNSON, 1977; LOBATO, 1990). Amostras foram colhidas antes e após a inativação para testes de verificação da inativação viral. Após a inativação, a suspensão viral foi dialisada em PBS por 24 horas, a 4°C, para retirada da BPL e seus produtos de degradação (SAMBROOK et al, 1989).

A suspensão viral foi submetida à filtração em membrana de 0,22 μ m de éster de celulose. Uma alíquota foi retirada para realização do teste de esterilidade e o restante da amostra foi armazenado a -20°C.

4.2.5. Verificação da inativação viral

A inativação do vírus foi verificada por meio da inoculação de amostras da

suspensão viral inativada em monocamada de células ST. A monocamada de células foi preparada em uma placa de 24 orifícios no dia anterior ao teste de inativação, contendo 70000 células/cm² em cada orifício. No dia do teste, quando a monocamada estava com cerca de 60% de confluência, o meio de cultura foi retirado e a monocamada lavada com PBS por duas vezes. Em seguida, foram acrescentados os inóculos a serem testados, sendo eles 0,75ml da suspensão inativada (em duplicata), 0,75ml da suspensão viral antes da inativação (em duplicata) e 0,75 ml de meio sem SFB (em duplicata) para o controle de células. A placa foi levada para estufa com 5% de CO₂ e incubada por 1 hora a 37°C. Após 1 hora, completou-se o volume em cada orifício para 2ml, com meio contendo 5% de SFB. A placa foi observada por 96 horas para verificação de efeito citopático.

4.2.6. Teste de esterilidade da suspensão viral

Para o teste de esterilidade, foi desenvolvido um procedimento adaptado a partir do método direto descrito no capítulo V.5.1.1 da Farmacopeia Brasileira 4ª edição (BRASIL, 1988). Este método consiste na transferência asséptica da suspensão viral para meio tioglicolato fluido, seguido de incubação a 30-35°C, por 14 dias. O meio tioglicolato é indicado para crescimento, especialmente, de anaeróbios, além de aeróbios, fungos e leveduras (BRASIL, 1988). Foi realizado o acompanhamento diário dos tubos para observar a turvação em caso de contaminação.

4.3. Obtenção dos adjuvantes

4.3.1. Materiais utilizados

4.3.1.1. Para o preparo das emulsões múltiplas e microemulsões:

- Miristato de isopropila (metiletil tetraecanoato). Utilizado como fase oleosa da emulsão múltipla e da microemulsão. É um óleo incolor e praticamente sem cheiro, formado de ésteres de propan-2-ol e cadeias de ácido graxo de elevada massa molecular, principalmente ácido mirístico. É amplamente utilizado como solvente em produtos parenterais por ser metabolizável, sendo esta a principal vantagem para o uso deste óleo para inoculação em animais de produção.
- Tween 80 (polietileno 20 sorbitano monooleato). Utilizado como emulsionante hidrofílico da emulsão múltipla e da microemulsão. Também usado na formulação das microesferas e implantes de quitosana. É um emulsionante não iônico amplamente utilizado em formulações farmacêuticas parenterais. Isoladamente também possui atividade adjuvante.
- Monooleato de manitol. Utilizado como emulsionante lipofílico da emulsão múltipla. É um éster constituído de manitol como resíduo hidrofílico e de ácido oléico, C18, como resíduo hidrofóbico.
- Propilenoglicol (1-2-propanodiol). Utilizado como co-emulsificante da Microemulsão. É um líquido incolor, límpido, viscoso e praticamente sem odor, bastante utilizado em formulações parenterais.

4.3.1.2. Para o preparo da microesferas e implantes de quitosana:

- Quitosana em pó fino: pó branco, semi-cristalino, composto de

aminopolissacarídeo biodegradável, hidrofílico, não tóxico e biocompatível, obtido a partir da desacetilação da quitina. É classificada como um polímero heterogêneo, porque possui na cadeia polimérica tanto monômeros acetilados quanto desacetilados. Em contato com substâncias ácidas é possível sua moldabilidade sob forma de membranas, gel, esferas e microesferas. A quitosana utilizada neste experimento apresentava um grau de acetilação maior que 85%.

Com exceção da quitosana, toda matéria prima utilizada nas formulações dos adjuvantes é autorizada para uso injetável pela Farmacopeia dos Estados Unidos (United States, 2000), que é usada como referência quando ainda não há descrição do produto na Farmacopeia Brasileira. Por se tratar de um produto ainda em fase de experimentação, a quitosana ainda não está incluída em nenhuma farmacopeia para fins de inoculação. Os demais reagentes e meios biológicos utilizados possuíam grau analítico ou farmacêutico.

4.3.2. Preparo da emulsão múltipla:

A emulsão múltipla foi preparada sob condições assépticas, pelo método conhecido como dupla emulsificação (SEILER et al, 1998), onde primeiro foi preparada uma emulsão primária do tipo A/O (água em óleo) através da agitação elevada de uma mistura contendo uma fase oleosa, uma fase aquosa interna e um emulsionante lipofílico (Fig. 6). A emulsão primária produzida foi vertida lentamente em uma fase aquosa externa contendo emulsionante hidrofílico, sob agitação mais baixa, para evitar o rompimento dos glóbulos recém formados.

Como matérias-primas para a formulação da emulsão primária foram utilizadas:

- Fase aquosa interna: foi testada solução de NaCl 0,9% em proporções que variaram de 51 a 56%.
- Fase oleosa: foi testado miristato de isopropila em proporções que variavam de 40 a 45% e a vaselina líquida nas mesmas proporções.
- Emulsificante lipofílico: foi testado o Monooleato de manitol em proporções que variavam de 4 a 5%.
- Emulsigen® também foi testado como matéria prima na fabricação da emulsão primária, mas por se tratar de segredo industrial, não se sabe quais são a sua fase oleosa e seu emulsificante.

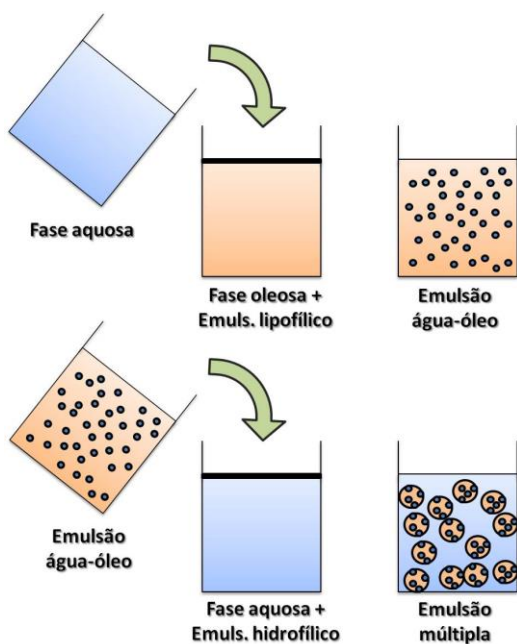


Figura 6- Obtenção da Emulsão Múltipla através do método da dupla emulsificação. Na primeira etapa é preparada uma emulsão primária do tipo água em óleo, sob agitação elevada. Posteriormente, esta emulsão primária é vertida lentamente sobre uma segunda fase aquosa contendo emulsificante lipofílico, então submetida a uma agitação mais baixa.

A emulsão primária foi feita sob agitação elevada (>2000rpm). Ela foi adicionada aos poucos a uma solução aquosa de Tween 80, sob baixa agitação (<500rpm), até a formação da emulsão múltipla. O béquer que continha a emulsão primária foi pesado antes e depois da formação da emulsão múltipla para que, conhecendo-se a quantidade de emulsão primária consumida para sua formação, fosse estabelecida a melhor porcentagem a ser acrescentada à solução para que a emulsão múltipla fosse mais rapidamente formada.

4.3.3.Preparo da microemulsão:

A microemulsão foi obtida utilizando o método da titulação com co-emulsificante modificado (OLIVEIRA et al, 2004). Primeiro foi obtida uma emulsão simples O/A com elevada concentração de emulsificante hidrofílico. Depois foi adicionado um co-emulsificante até a obtenção da microemulsão, caracterizada por sua transparência.

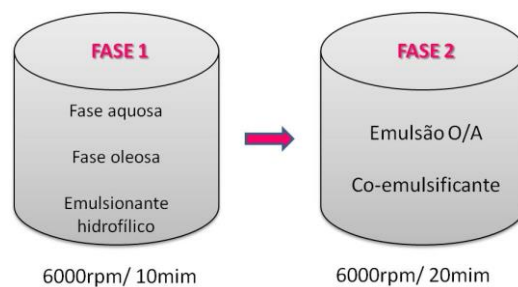


Figura 7- Obtenção da microemulsão através do método da titulação com co-emulsificante modificado. Na fase 1 é preparada uma emulsão simples óleo-água com elevada concentração de emulsificante hidrofílico. Na fase 2 é adicionado um co-emulsificante, que é mantido sob elevada agitação até a obtenção da microemulsão.

Como matérias primas para elaboração da microemulsão foram utilizados:

- Fase aquosa: solução de NaCl 0,9%.
- Fase oleosa: miristato de isopropila.
- Emulsificante hidrofílico: Tween 80.
- Co-emulsificante: propilenoglicol.

A microemulsão foi preparada utilizando as seguintes proporções: 30% de Tween 80 (m/v), 5% de miristato de isopropila (m/v), 5% de propilenoglicol (m/v) e 60% de solução salina (v/v). Primeiramente, o miristato e o Tween 80 foram homogeneizados e em seguida foi adicionada metade da solução aquosa. O sistema foi mantido sob agitação a 6000rpm por 10 minutos. O propilenoglicol foi adicionado com o restante da solução aquosa. A agitação se manteve por mais 20 minutos à mesma velocidade. A formação das microemulsões foi evidenciada através da observação de sua transparência.

4.3.4. Preparo das microesferas de quitosana

Uma solução aquosa de 1% de Tween 80 (m/v) foi preparada, contendo quantidade suficiente de ácido acético para obter pH 3. Quitosana em pó foi adicionada a esta solução na concentração de 0,25% (m/v), que foi colocada sob agitação mecânica constante de 400rpm até sua completa dissolução (ver esquema da Fig.8). Durante a agitação foram adicionados 3% de uma solução de sulfato de sódio a 20% (m/v), gotejada a um fluxo de 3 mL/min. Após a adição do sulfato de sódio, a agitação foi mantida por 24 horas a 170rpm a temperatura ambiente. A separação das micropartículas foi realizada por centrifugação a 3800 g por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e as partículas precipitadas foram lavadas com água para retirada do tensoativo e centrifugadas novamente. Este procedimento foi repetido por duas vezes. Após a última lavagem, as micropartículas foram liofilizadas e armazenadas à temperatura ambiente.

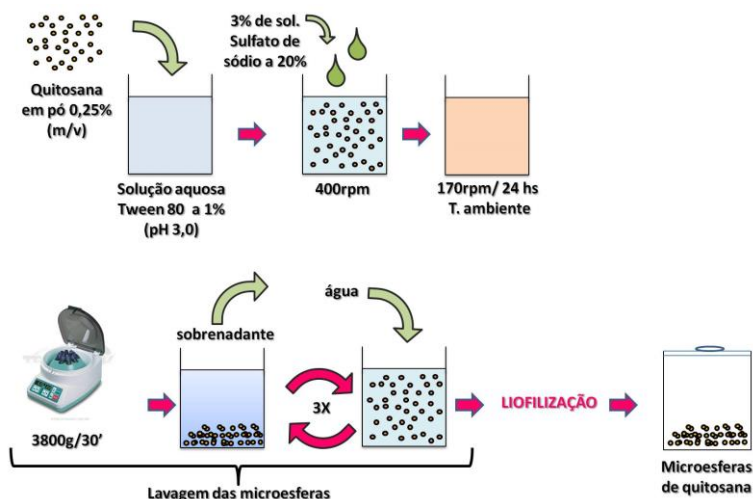


Figura 8- Esquema demonstrando a obtenção das esferas de quitosana. Primeiramente, quitosana em pó foi adicionada a uma solução aquosa ácida. Após sua completa diluição, uma solução de sulfato de sódio foi adicionada e a mistura foi mantida sob baixa agitação durante 24 horas. As microesferas obtidas foram então lavadas e centrifugadas três vezes antes de serem liofilizadas.

4.3.5. Preparo dos implantes de quitosana

Os implantes de quitosana foram preparados a partir das microesferas de quitosana. Após a liofilização das microesferas, estas foram colocadas em uma prensa, que foi responsável pela sua moldagem em implantes (Fig.9).



Figura 9- Obtenção dos implantes de quitosana a partir da prensagem das microesferas de quitosana.

4.4. Teste de Inocuidade

4.4.1. Inoculação dos adjuvantes

Este teste teve como objetivo observar possíveis reações locais inflamatórias decorrentes do uso dos adjuvantes formulados em cobaias. Foram utilizadas 16 cobaias (*Cavia porcellus*) fêmeas pesando entre 400 e 600 gramas. Os animais foram mantidos no biotério da Escola de Veterinária da UFMG, alimentados com

água, verde e ração “*ad libidum*” e para prevenção da hipovitaminose C foram adicionados 200mg de vitamina C em cada litro de água oferecida aos animais (HARKNESS e WAGNER, 1993). Os animais foram divididos em quatro grupos, sendo que o grupo 1 recebeu o adjuvante microemulsão, o grupo 2 o adjuvante emulsão múltipla, o grupo 3 o adjuvante microesferas de quitosana e o grupo 4 recebeu os implantes de quitosana. Todos os adjuvantes formulados foram testados quanto a inocuidade através da inoculação de 1ml de cada formulação de adjuvante desenvolvida no dorso dos animais, via subcutânea, em 4 animais/formulação, exceto quanto aos implantes de quitosana, que foram implantados cirurgicamente no subcutâneo desses animais, como demonstrado na Fig. 10, após anestesia geral dos animais, utilizando tiopental sódico intramuscular, na concentração de 55mg/kg como preconizado por ALLEN (1994). Estes implantes foram hidratados antes da implantação, durante cinco minutos, utilizando PBS 0,15M, pH 7,2, já que, em um experimento inicial, implantes não hidratados foram expulsos após oito dias de implantação devido à sua alta higroscopia.

O uso de animais foi autorizado segundo protocolo CETEA-UFMG nº 142/11 (anexo 1).



Figura 10- Introdução cirúrgica do implante de quitosana no tecido subcutâneo de animal submetido ao teste de inocuidade.

Os animais foram observados por 14 dias e a espessura da pele foi medida diariamente,

com o auxílio de um cutímetro (Fig. 11). A temperatura dos animais foi aferida durante

sete dias após a inoculação das formulações dos adjuvantes. Quando do aparecimento de lesões e/ou edema extenso e bem delimitado, seus diâmetros foram mensurados através do uso de um paquímetro (Fig. 10) e suas características descritas. Todas as aferições e observações

foram feitas no período matutino. O próprio animal foi utilizado como controle, já que todas as aferições de temperatura e espessura de pele foram também realizadas antes de todas as inoculações (dia 0), para posteriores comparações.



Figura 11- Aferição da espessura da pele para estudo da intensidade das reações inflamatórias locais.

Na ocorrência de febre alta, reações muito agudas e/ou lesões muito extensas, como foi observado no grupo 2, que recebeu o adjuvante emulsão múltipla (ver resultados), o experimento foi imediatamente cancelado e o animal acometido submetido a eutanásia segundo normas estabelecidas pelo CETEA-UFMG.

4.4.2. Análise das lesões decorrentes da aplicação dos adjuvantes

Todos os animais inoculados foram submetidos à eutanásia e necropsiados em diferentes períodos (ver cronograma no

quadro 2) para descrição das possíveis lesões no tecido subcutâneo e carcaça para posterior avaliação da evolução destas lesões durante os três meses seguintes à inoculação. A eutanásia se deu por anestesia geral utilizando tiopental sódico intramuscular, na concentração de 165mg/kg (três vezes a dose anestésica referenciada por ALLEN, 1994). Amostras de tecidos contendo lesões provocadas pela inoculação das formulações testadas foram coletadas e fixadas em formol 10%. As amostras foram processadas rotineiramente para exame histológico e corados pela técnica de hematoxilina e eosina (PROPHET et al, 1992).

Quadro 2- Cronograma utilizado durante o teste de inocuidade dos adjuvantes formulados:

Eutanásia e Necropsia	Dia 15	Dia 30	Dia 60	Dia 90
Grupo 1	Animal 1	Animal 5	Animal 9	Animal 13
Grupo 2	Animal 2	Animal 6	Animal 10	Animal 14
Grupo 3	Animal 3	Animal 7	Animal 11	Animal 15
Grupo 4	Animal 4	Animal 8	Animal 12	Animal 16

As condições ótimas de temperatura e ciclos foram determinadas através de um ensaio em um termociclador de gradiente (MastwerCycle – Eppendorf). Foram testadas temperaturas entre 50 e 60°C e variações entre 25 a 35 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão das fitas de DNA.

Após padronização das condições da PCR, o gene da VP2 amplificado foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1,2% (conforme descrito em SAMBROOK et al, 1989). Ele foi purificado a partir do gel de agarose de acordo com o protocolo do fabricante do kit comercial “Nucleospin Extract II” (Marcherey-Nagel).

4.5.3. Sequenciamento do gene amplificado pela PCR padronizada

O produto da PCR padronizada foi submetido a um sequenciamento de seus pares de bases no laboratório de Biologia Molecular da UnB para confirmação da correta amplificação do gene da VP2 do PVS. A sequência foi comparada com outras sequências de DNA e proteínas relacionadas e previamente depositadas em banco de dados GenBank, pelo programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponível na página do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

4.5.4. Clonagem do gene VP2 em pGem T-easy® e pFastBac Dual®

O fragmento de DNA amplificado referente ao gene VP2 foi primeiramente clonado em um vetor de clonagem, o plasmídeo p-Gem T easy® (Promega™) de acordo com as instruções do fabricante e transformado em células *E. coli* DH5 competentes (SAMBROOK et al, 1989). O DNA plasmidial das colônias positivas foi

extraído usando o kit comercial ILLUSTRATE Plasmid Prep Mini Spin Kit® (GE HealthCare™). Após a extração, uma alíquota foi submetida a digestão enzimática com *EcoRI* segundo as instruções do fabricante e analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% (conforme descrito em SAMBROOK et al, 1989), para confirmação da clonagem.

O fragmento clonado foi extraído do vetor de clonagem através de digestão enzimática e posterior eluição da banda contendo a VP2 (1740pb) utilizando kit comercial GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE HealthCare™). Este fragmento foi então clonado em um dos sítios de multiclonagem do vetor de expressão, o plasmídeo pFastBac Dual® (Invitrogen™), de acordo com as instruções do fabricante. Uma alíquota deste plasmídeo (pFastBac Dual-VP2) foi submetida a uma digestão enzimática com *EcoRI*, *HindIII* e *NsiI* para confirmação da clonagem.

4.5.5. Obtenção dos bacmídeos e baculovírus recombinantes com VP2 (VLP-PPS)

Para obtenção dos bacmídeos e baculovírus recombinantes contendo o gene da VP2 foi utilizado o kit de expressão em células de inseto Bac to Bac Baculovirus Expression Systems® (Invitrogen™) segundo instruções do fabricante (Vide esquema Fig.13).

4.5.6. Transfecção das células de inseto com o DNA do bacmídeo recombinante

O DNA dos bacmídeos foi extraído utilizando o kit comercial *Kit Nucleospin Extract II* (Marcherey-Nagel). O DNA “nu” foi transfectado diretamente em células de inseto [TN5-B (Invitrogen™)], com o auxílio do reagente Cellfectin®

(Invitrogen™) seguindo o protocolo preconizado pelo fabricante.

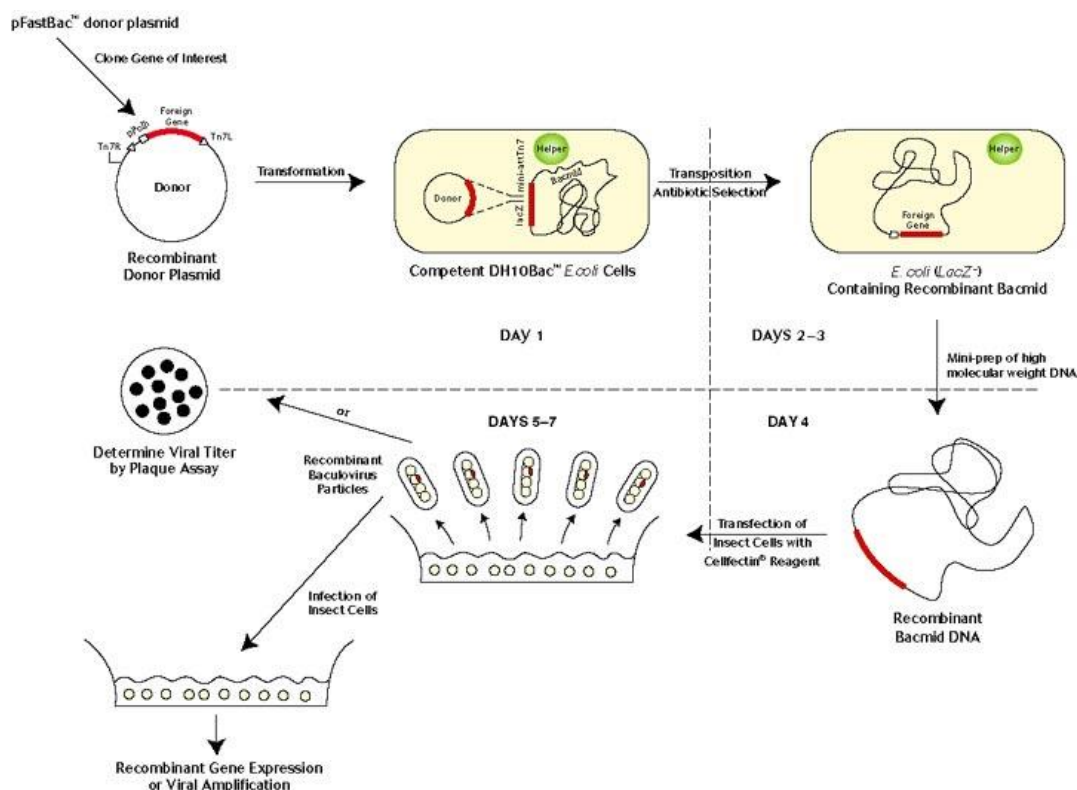


Figura 13- Esquema demonstrando como foram obtidos os bacmídeos e baculovírus recombinantes contendo o gene da VP utilizando o kit de expressão em células de inseto Bac to Bac Baculovirus Expression Systems® (Invitrogen™).

Após a transfecção, amostras do sobrenadante foram coletadas diariamente, clarificadas por centrifugação 3500rpm por 3 minutos e submetidas à análise por meio de SDS PAGE para que a expressão da proteína VP2 fosse demonstrada. Esse sobrenadante foi também usado para amplificação viral e determinação do título

viral através de ensaio de placas (DULBECCO e VOGT, 1953). Novas células TN5-B foram infectadas com o vírus recombinante (10pfu/célula) e após 72 horas de infecção, as células foram tratadas (BOZZOLA, 2007) e submetidas à microscopia eletrônica para observação da presença de VLP no citoplasma.

4.6. Obtenção das vacinas inativadas

4.6.1. Material utilizado:

4.6.1.1. Para o preparo das vacinas aquosas a base de hidróxido de alumínio:

- Adjuvante comercial Rehydragel LV® (Reheis, Berkeley Heights, NJ, USA). Dispersão coloidal de hidróxido de alumínio.

4.6.1.2. Para o preparo das vacinas a base de emulsão óleo/água:

- Adjuvante comercial Emulsigen® (MVPLabs, Omaha, NE, USA). Emulsão O/A, autorizada pelo USDA para uso em vacinas veterinárias, para injeção intramuscular ou subcutânea. Não se conhece sua formulação por se tratar de segredo industrial.

4.6.1.3. Vacina comercial

Uma vacina comercial contendo partículas virais inativadas e com hidróxido de alumínio como adjuvante foi adquirida para inoculação em cobaias e sua posterior comparação com a vacina inativada aquosa produzida durante esse experimento. Esta vacina comercial foi escolhida aleatoriamente entre as várias produzidas por laboratórios conceituados que estão disponíveis no mercado. Como o objetivo do trabalho não foi citar qual vacina comercial é eficaz ou não, a empresa fabricante não foi mencionada. Como não havia uma vacina comercial oleosa disponível no mercado durante o período do experimento, não foi possível a comparação deste tipo de vacina com a vacina oleosa produzida durante o experimento.

4.6.2. Elaboração da vacina a base de microemulsão

Esta vacina foi preparada substituindo a solução de NaCl 0,9% da formulação descrita no item 4.3.3 pela suspensão viral inativada. Com o auxílio de um bastão de vidro estéril, o miristato de isopropila e o tween 80 foram homogenizados. A suspensão viral foi adicionada e o sistema foi agitado por 25 minutos a 6000rpm no OCI Instruments Omni Mixer (Sorval). Depois foi adicionado o propilenoglicol e agitou-se por mais 25 minutos a 6000rpm. A vacina foi conservada a 4°C até o momento do uso.

4.6.3. Elaboração da vacina em microesferas de quitosana

Para elaboração dessa vacina, o tween 80 puro foi adicionado à suspensão viral inativada na concentração final de 1g/100mL. O pH foi ajustado para 3 com ácido acético e a quitosana em pó foi adicionada (0,25% p/v) e mantida sob agitação contante (400rpm) até sua completa dissolução. Ainda sob agitação, foram adicionados 3% de uma solução de sulfato de sódio a 20% (m/v), gotejada a um fluxo de 3mL/min. Após a adição do sulfato de sódio, a agitação foi mantida por 24 horas a 170rpm a temperatura ambiente. A separação das micropartículas foi realizada por centrifugação a 3800g por 30 minutos. O sobrenadante foi reservado à parte (utilizado posteriormente em um teste para verificação do índice de adsorção viral às esferas de quitosana) e as partículas precipitadas foram lavadas com água para retirada do tensoativo e centrifugadas novamente. Este procedimento foi repetido por duas vezes. Após a última lavagem, as micropartículas foram liofilizadas e armazenadas à temperatura ambiente.

4.6.4. Elaboração de vacina em implantes de quitosana

As microesferas obtidas após a elaboração da vacina do item anterior foram prensadas para confecção dos implantes contendo o PVS adsorvido. Os implantes foram armazenados à temperatura ambiente.

4.6.4.1. Teste para verificação do índice de adsorção viral às microesferas de quitosana

Uma alíquota da solução contendo a suspensão viral (adicionada de tween 80 e de solução de sulfato de sódio) foi coletada antes de essa solução ser mantida sob agitação por 24 horas. Outra alíquota foi coletada do sobrenadante resultante da separação das micropartículas de quitosana após a centrifugação. As duas alíquotas foram submetidas à dosagem de proteínas utilizando espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific) e ao teste de hemaglutinação em placas para verificação do índice de adsorção viral às esferas de quitosana. A eficiência de incorporação foi determinada pela diferença da quantidade de proteínas antes e após a adsorção da suspensão viral.

4.6.5. Elaboração de vacina aquosa

Hidróxido de alumínio foi utilizado como adjuvante para obtenção de uma vacina aquosa, usada na comparação com outros adjuvantes formulados no teste de potência da vacina em cobaias.

Para o preparo da vacina, a suspensão viral inativada foi utilizada contendo um título de 1024 UHA. Rehydragel® numa concentração final de 10% foi acrescentado à suspensão viral, sob condições assépticas e mantido sob agitação 1700rpm à

temperatura ambiente por 24 horas. A vacina foi conservada a 4°C até o momento do uso.

4.6.6. Elaboração de vacina a base de emulsão óleo-água.

Emulsigen® foi utilizado como adjuvante para obtenção de uma vacina a base de emulsão óleo-água, usada na comparação com outros adjuvantes formulados no teste de potência da vacina em cobaias.

A fórmula utilizada na preparação da vacina foi composta de Rehydragel® 5%, Emulsigen® 20% e suspensão viral inativada 75%, segundo orientação do fabricante. Sob condições assépticas, a suspensão viral foi misturada com Rehydragel® e mantida sob agitação por 1 hora a 2000rpm em temperatura ambiente. Então o Emulsigen® foi adicionado e agitação foi mantida por mais 24 horas. A vacina foi conservada a 4°C até o momento do uso.

4.7. Obtenção das vacinas de subunidades:

Três vacinas de subunidades foram produzidas. A primeira foi feita sem a adição de adjuvantes, utilizando apenas o sobrenadante das células infectadas com o baculovírus recombinante-VP2, descrito no item 4.5.6. A segunda foi feita utilizando o hidróxido de alumínio como adjuvante, substituindo a suspensão viral inativada, descrita no item 4.6.5, pelo sobrenadante das células TN5-B infectadas. A terceira foi produzida utilizando a microemulsão como adjuvante, tendo como fase aquosa o sobrenadante das células TN5-B infectadas ao invés da solução de NaCl 0,9% descrita no item 4.3.3.

Os sobrenadantes coletados das células TN5-B infectadas foram titulados através

da técnica de hemoaglutinação em placas de fundo V, segundo JOO, DONALSON-WOOD e JOHNSON (1976b). A titulação foi expressa em título hemoaglutinante. Foram selecionados os sobrenadantes que possuíam títulos de 1024 UHA para produção das vacinas de subunidades.

4.8. Testes

4.8.1. Estabilidade

Todas as formulações desenvolvidas foram mantidas à temperatura ambiente e a 4°C para determinação do tempo de estabilidade. Foram consideradas estáveis as amostras que continuavam com aparência homogênea, sem se separar em fases distintas.

4.8.2. Esterilidade

Para o teste de esterilidade das vacinas também foi desenvolvido um procedimento adaptado a partir do método direto descrito no capítulo V.5.1.1 da Farmacopéia Brasileira 4ª edição (BRASIL, 1988), com a transferência asséptica da vacina obtida para meio tioglicolato fluido seguido de incubação a 30-35°C por 14 dias. Como algumas das formulações obtidas causavam turvação dos meios de cultura, de modo a impedir a observação do crescimento microbiano, a cada 24 horas, durante sete dias após o início da incubação, uma

amostra da vacina transferida para o meio tioglicolato era novamente transferida para outro meio tioglicolato. Foi realizado o acompanhamento diário dos tubos para observar a turvação em caso de contaminação até que se completassem os 14 dias do início do teste.

4.8.3. Teste de potência em cobaias

Foram utilizadas 66 cobaias (*Cavia porcellus*) fêmeas pesando entre 400 e 600 gramas. O uso dessa espécie é justificado por JOO, MOLITOR e LEMAN (1984); BENGELSOORFF (1987) e JERABEK et al (1987), onde a avaliação da resposta imune humoral demonstrou que cobaia é a espécie modelo para teste de potência de vacinas contra o parvovírus suíno, já que os títulos de anticorpos produzidos nesta espécie são comparáveis aos títulos produzidos pelos suínos. Os animais foram mantidos no biotério da Escola de Veterinária da UFMG, alimentados com água, verde e ração “*ad libidum*” e para prevenção da hipovitaminose C foram adicionados 200mg de vitamina C em cada litro de água oferecida aos animais (HARKNESS, JE; WAGNER JE; 1993). Os animais foram divididos aleatoriamente em onze grupos conforme quadro 3, contendo seis animais/grupo.

Quadro 3- Relação dos grupos experimentais utilizados no teste de potência das vacinas formuladas.

GRUPO	INOCULAÇÃO
1	Vacina aquosa contendo adjuvante comercial
2	Vacina emulsão óleo/água contendo adjuvante comercial
3	Vacina inativada contendo microesferas de quitosana
4	Vacina inativada contendo implantes de quitosana
5	Vacina inativada contendo microemulsão
6	Suspensão viral sem adjuvante (Diluído em PBS)
7	Vacina comercial com hidróxido de alumínio
8	Controle (Somente PBS)
9	Vacina de subunidades sem adjuvante
10	Vacina de subunidades contendo hidróxido de alumínio
11	Vacina de subunidades contendo microemulsão

Os animais foram vacinados no dorso, duas vezes, por via subcutânea, sendo que cada um recebeu 1ml de vacina, salina ou suspensão viral diluída, sendo 500ul/local, com intervalo de 14 dias. As sangrias foram feitas no dia da primeira (dia zero), no dia da segunda (dia 14) e 14 dias após a última inoculação (dia 28). A sangria dos animais foi realizada pela via intracardíaca, após anestesia geral dos animais, utilizando o tiopental sódico intramuscular, na concentração de 55mg/kg como preconizado por ALLEN (1994).

Anticorpos anti-PVS do soro das cobaias vacinadas foram mensurados pela técnica de inibição da hemaglutinação (HI) utilizando 8 UHA por diluição de soro (JOO et al, 1976a). Os resultados foram dados em título inibidor da hemoaglutinação, que foi expresso como a recíproca da maior diluição do soro capaz de inibir totalmente a hemaglutinação.

4.9. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através dos testes de Kruskal Wallis e Mann-Whitney, considerando significativos os valores de $p < 0,05$. O programa utilizado foi o STATA v.12.1.

5. RESULTADOS

5.1. Obtenção do antígeno

Houve grande dificuldade em produzir amostras virais com altos títulos hemaglutinantes. Tentou-se a purificação por diluições em ponto final durante três passagens com o objetivo de eliminar ou diminuir o número de partículas defectivas resultantes de passagens consecutivas do parvovírus suíno. As amostras obtidas apresentaram títulos hemaglutinantes de 512 a 2048. Todas as amostras foram aliquotadas e congeladas -80°C . As

amostras contendo título de 2048 foram utilizadas como semente. Quando a semente foi inoculada para obtenção da suspensão viral, observou-se títulos hemaglutinantes variando de 256 a 1024. As suspensões virais que continham o título de 1024UHA foram escolhidas para elaboração das vacinas.

5.1.1. Inativação viral

As suspensões virais contendo título de 1024 foram submetidas ao processo de inativação com BPL, seguida de diálise e filtração. Durante a verificação da inativação através da inoculação em células, os dois poços inoculados com a suspensão viral antes da inativação apresentaram início de efeito citopático trinta e seis horas após a infecção, com arredondamento de células e aparecimento de algumas inclusões nucleares. Quarenta e oito horas após a infecção já se observava morte celular e setenta e duas horas após a infecção, o efeito já atingia todo o poço, com 90% de desprendimento das células da monocamada. Os dois poços onde havia sido inoculada a suspensão após inativação e nos dois poços controle não houve efeito citopático durante os cinco dias de teste, confirmando a inativação do vírus. A amostra que foi submetida ao teste de HA após o processo de inativação apresentou título hemaglutinante de 1024.

5.1.2. Teste de esterilidade da suspensão viral

Após os 14 dias de teste, não houve turvação do meio tioglicolato do tubo inoculado com a suspensão viral inativada, confirmando que não houve nenhum crescimento microbiano na solução. A suspensão viral inativada foi aprovada no teste de esterilidade.

5.2. Obtenção dos adjuvantes

5.2.1. Emulsão múltipla (EM)

Primeiramente, várias combinações de reagentes, em diferentes concentrações, foram testadas para obtenção da emulsão

primária (EP), como esquematizado na Tab. 1.

Tabela 1- Formulações testadas para formação de emulsão primária durante a primeira etapa de emulsificação, para produção do adjuvante emulsão múltipla.

Emulsão primária	Fase oleosa/ Concentração	Emulsionante/ Concentração	Fase aquosa/ Concentração	Velocidade e tempo de agitação	Agitador utilizado	Formação da emulsão primária
1	MIP (45%)	Monooleato de manitol (4%)	Solução de NaCl 0,9% (51%)	4000rpm/40'	Ultra Turrax IKA T18 Basic (IKA Labortechnik)	Sim
2	MIP (45%)	Monooleato de manitol (4%)	Solução de NaCl 0,9% (51%)	2000rpm/ 1 hora e 30'	Eurostar Power B (IKA Labortechnik)	Não
3	Vaselina líquida (45%)	Monooleato de manitol (4%)	Solução de NaCl 0,9% (51%)	2000rpm/ 1 hora	Eurostar Power B (IKA Labortechnik)	Sim
4	MIP (40%)	Monooleato de manitol (4%)	Solução de NaCl 0,9% (56%)	2000rpm/ 1 hora e 40'	Eurostar Power B (IKA Labortechnik)	Sim
5	MIP (40%)	Monooleato de manitol (4%)	Suspensão celular (56%)	2000rpm/ 1 hora e 40'	Eurostar Power B (IKA Labortechnik)	Não
6	MIP (40%)	Monooleato de manitol (4%)	Suspensão celular (56%)	1 hora	Vortex Genie 2 (Scientific Industries)	Não
7	MIP (45%)	Monooleato de manitol (4%)	Suspensão celular (51%)	2000rpm/ 1 hora e 30'	Eurostar Power B (IKA Labortechnik)	Sim
8	Emulsigen 20% + Rehydrigel 5%		Suspensão celular (75%)	2000rpm/ 1 hora	Eurostar Power B (IKA Labortechnik)	Sim
9 a 18	Emulsigen de 5 a 50%		Suspensão celular (50 a 95%)	2000rpm/ 1 hora	Eurostar Power B (IKA Labortechnik)	Não
19 a 28	Emulsigen de 5 a 50%		Suspensão celular (50 a 95%)	6000rpm/ 25'	OCI Instruments Omni Mixer (Sorval)	Não
29	MIP (45%)	Monooleato de manitol (5%)	Suspensão celular (50%)	6000rpm/ 25'	OCI Instruments Omni Mixer (Sorval)	Não
30	MIP (45%)	Monooleato de manitol (4%)	Suspensão celular (51%)	6000rpm/ 25'	OCI Instruments Omni Mixer (Sorval)	Sim

Das trinta formulações testadas, somente em seis houve a formação da EP. As EP formadas foram adicionadas à solução

aquosa de Tween com o objetivo de se formar uma EM. Os resultados encontrados estão esquematizados na Tab.2.

Tabela 2- Formulações testadas para formação de EM durante a segunda etapa de emulsificação, para produção do adjuvante emulsão múltipla.

Emulsão primária	Fase aquosa da EP	Porcentagem da EP	Tween	Água	Velocidade e tempo de agitação	Agitador utilizado/haste	Formação da emulsão múltipla
1	NaCl 0,9%	79%	1%	20%	<500rpm/1h	Eurostar Power B (IKA Labor Technik) com haste grande	Não
1	NaCl 0,9%	79%	1%	20%	<500rpm/25'	OCI Instruments Omni Mixer (Sorval)	Sim
3	NaCl 0,9%	79%	1%	20%	<500rpm/30'	Eurostar Power B (IKA Labor Technik)	Sim
4	NaCl 0,9%	50%	Solução aquosa de Tween a 1% (50%)		<500rpm/1 h e 40'	Eurostar Power B (IKA Labor Technik)	Não
7	Suspensão celular	79%	1%	20%	<500rpm/1 h e 30'	Eurostar Power B (IKA Labor Technik)	Não
8	Suspensão celular	79%	1%	20%	<500rpm/25'	OCI Instruments Omni Mixer (Sorval)	Não
30	Suspensão celular	79%	1%	20%	<500rpm/25'	OCI Instruments Omni Mixer (Sorval)	Não

As emulsões primárias 1 e 3 formaram emulsões múltiplas estáveis quando incorporadas na fase interna solução de NaCl 0,9% (Fig. 14a). Entretanto, a estabilidade destas emulsões foi quebrada à

medida que a solução de NaCl 0,9% foi substituída por suspensão de células ST em meio MEM contendo 2U/mL de penicilina G potássica, 2ul/mL de sulfato de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino,

o mesmo tipo de meio onde estava suspenso o PVS inativado que seria utilizado para obtenção da vacina. Nos testes de microscopia óptica pôde-se observar

claramente a ruptura dos glóbulos após a desestabilização da emulsão múltipla (Fig. 14b).

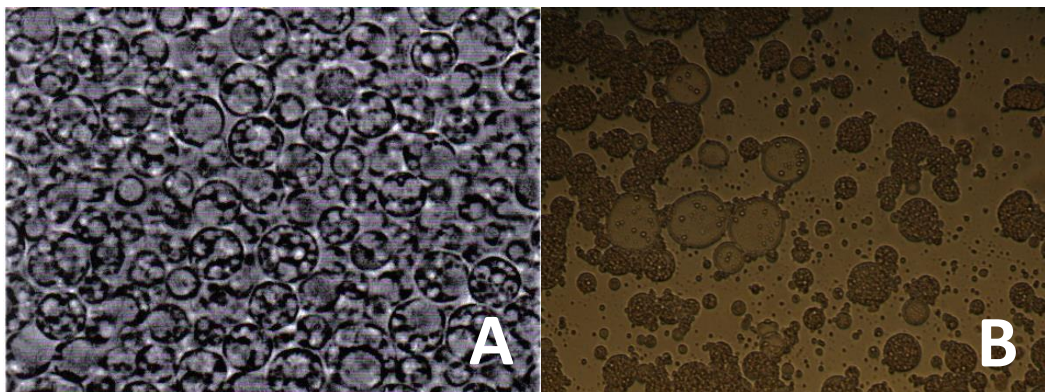


Figura 14- Foto de lâmina de microscopia óptica mostrando os glóbulos que evidenciam: (A) a formação emulsão múltipla e (B) a ruptura destes glóbulos após a desestabilização da emulsão múltipla que continha suspensão celular (aumento 1000X).

5.2.2. Microemulsão

Após o preparo, a microemulsão apresentava-se límpida e transparente, como demonstrado na Fig. 15.

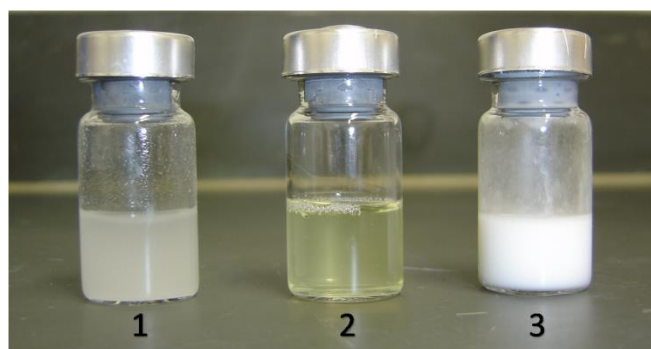


Figura 15- Aspecto visual dos adjuvantes formulados: (1) Microesferas de quitosana após reconstituição, (2) Microemulsão e (3) Emulsão Múltipla.

5.2.3. Microesferas de quitosana

Após a liofilização, as microesferas de quitosana apresentavam-se como um pó branco-amarelado (Fig. 16).



Figura 16- Aspecto das microesferas de quitosana.

Quando da inoculação das microesferas de quitosana para teste de inocuidade, estas foram ressuspensas em PBS. As microesferas ressuspensas não se dissolviam na solução, ficando sobre a forma de particulado. A suspensão apresentou-se turva, como demonstrado na Fig. 15.

5.2.4. Implantes de quitosana

Após a prensagem das microesferas foram produzidos implantes de 1,3 cm de diâmetro e de 1mm de espessura (Fig.17).



Figura 17- Implante de quitosana.

5.3. Análise das lesões decorrentes da aplicação dos adjuvantes

A medida da espessura da pele no local de aplicação dos adjuvantes e a aferição da temperatura dos animais inoculados estão

descritas na Fig. 18 e Tab. 3, respectivamente.

Tabela 3- Médias de temperatura de cobaias inoculadas (n=6) com os adjuvantes formulados, por via subcutânea, medida durante os primeiros sete dias de observação. Temperatura normal de cobaia= 37,2 a 39,5°C (Harkness e Wagner,1993).

Adjuvantes	Temperatura (C°)							
	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
MICROEMULSÃO	38,2	38,9	38,7	38,9	38,5	38,9	38,7	38,7
EMULSÃO MÚLTIPLA	38,5	38,9	38,7	38,5	39	38,9	38,6	38,9
MICROESFERAS DE QUITOSANA	39,1	38,7	38,4	38,8	38,8	38,5	38,7	39
IMPLANTE DE QUITOSANA	38,8	38,9	38,4	38,6	37,9	38,4	38,5	39

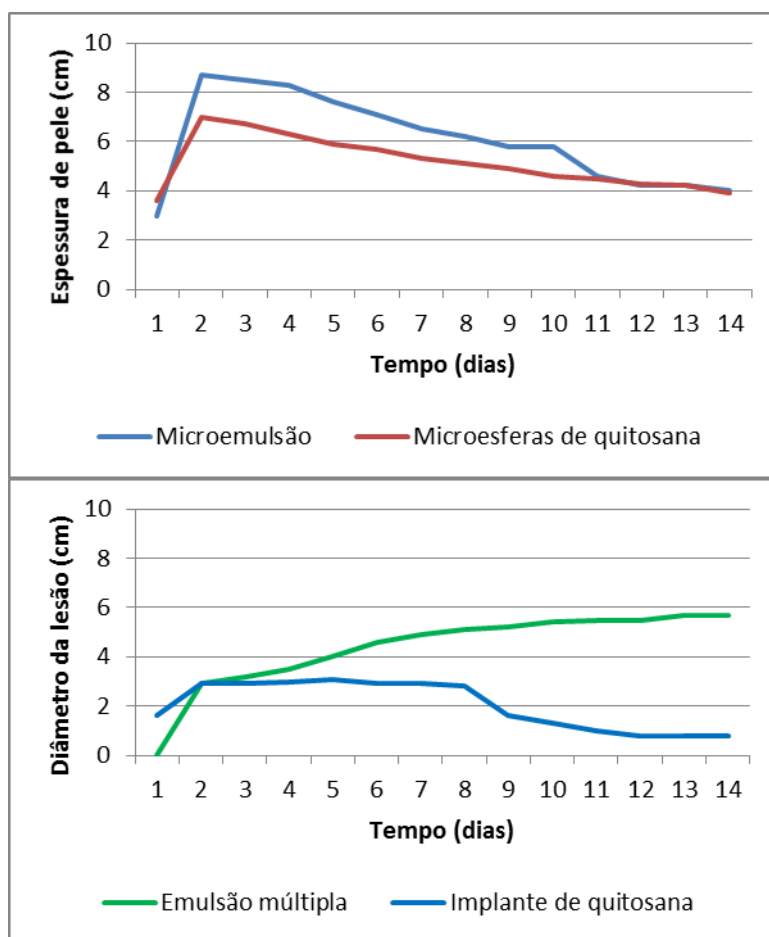


Fig.18- Médias de espessura da pele ou diâmetro de lesão de cobaias inoculadas com os adjuvantes formulados, por via subcutânea, medida durante os primeiros 14 dias de observação.

Nenhum dos animais dos quatro grupos inoculados apresentou febre após a inoculação das formulações dos adjuvantes. Após um período de aumento considerável de espessura da pele, com presença ou não de edema bem delimitado, em todos os grupos, com exceção do grupo onde foi inoculada a Emulsão Múltipla, houve regressão da espessura da pele para valores próximos aos do início do teste.

5.3.1. Análise macroscópica

5.3.1.1. Microemulsão

A partir do segundo dia, na pele dos animais inoculados com a Microemulsão

foram notadas pequenas áreas lisas e macias à palpação, pouco delimitadas e quase imperceptíveis a inspeção. Quinze dias após a inoculação do adjuvante, uma necropsia foi realizada em um dos animais deste grupo e foi evidenciado que essas áreas estavam situadas no tecido subcutâneo, apresentando aspecto fibroso (Fig. 19-A e A'). Nas três necropsias posteriores, realizadas nos dias 30, 60 e 90 pós inoculação, não havia nenhuma lesão macroscópica na área de inoculação, sugerindo a total regeneração da área inoculada com a Microemulsão em menos de 30 dias (vide evolução da lesão na Tab. 4).

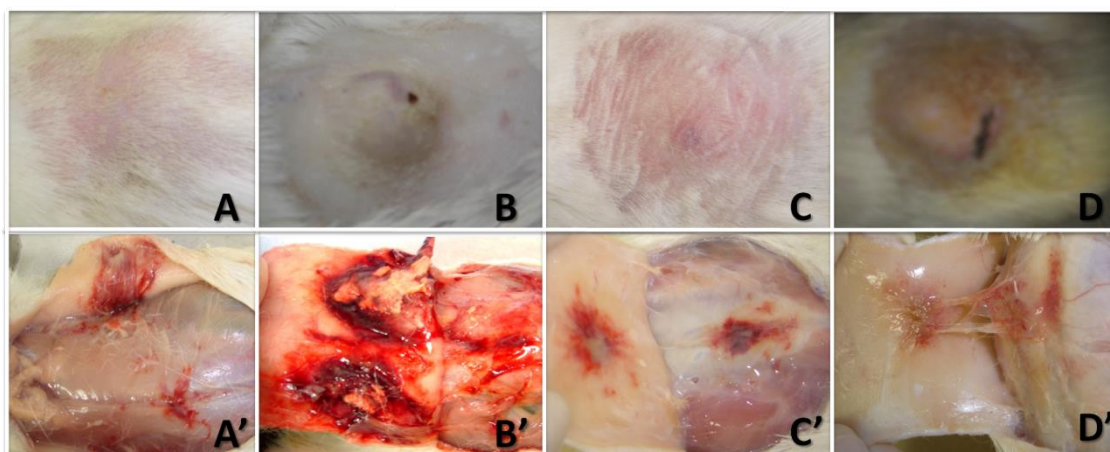


Figura 19- Teste de inocuidade. Lesões na pele dos cobaias 15 dias após a inoculação dos adjuvantes: Microemulsão (A e A'), Emulsão múltipla (B e B'), Microesferas de quitosana (C e C') e Implantes de quitosana (D e D').

5.3.1.2. Emulsão múltipla:

Nos animais que foram inoculados com a Emulsão Múltipla, um extenso nódulo bem delimitado, rugoso e duro foi observado após o segundo dia pós inoculação. Durante os primeiros 11 dias de avaliação, este nódulo foi aumentando de tamanho em todos os animais do grupo, quando então

dois desses animais apresentaram uma lesão em forma de úlcera sobre este. Aos 15 dias de observação, um animal que não tinha essa lesão ulcerativa (Fig. 19-B) foi eutanasiado e necropsiado, evidenciando uma área de extensa hemorragia no tecido subcutâneo, com a presença de uma grande massa branco-amarelada, firme e sem delimitação por cápsula fibrosa (Fig. 19-

B'). Com o passar do tempo, as lesões ulcerativas foram aumentando de tamanho e aos 21 dias após a inoculação da Emulsão Múltipla (Fig. 20), o teste de inocuidade deste adjuvante foi cancelado, evitando-se assim um sofrimento ainda maior dos animais deste grupo experimental. Os três

animais restantes foram eutanasiados e necropsiados e a Emulsão Múltipla foi retirada dos testes posteriores, não havendo inoculação deste adjuvante em mais nenhum animal. A Emulsão Múltipla foi reprovada no teste de inocuidade em cobaias.

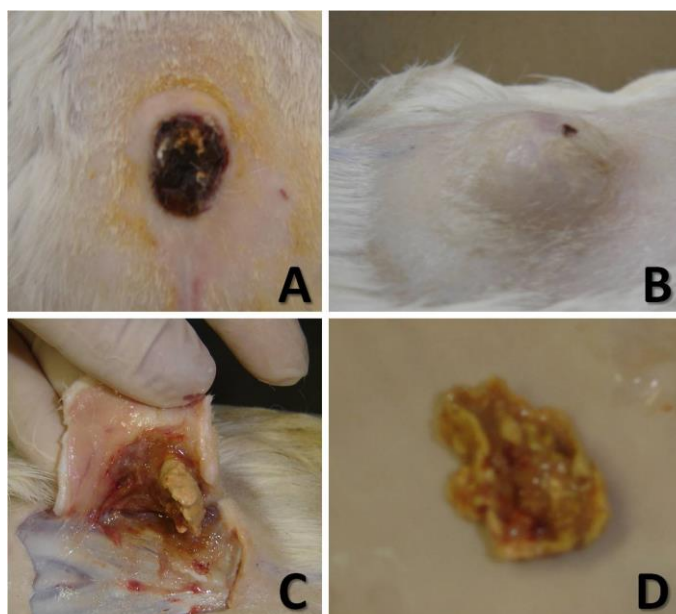


Figura 20- Avaliação macroscópica das lesões causadas pela inoculação da Emulsão Múltipla em cobaias após 21 dias de observação. Lesão ulcerativa (A) foi verificada em dois dos animais avaliados. Os outros dois animais apresentaram uma lesão nodular no local da aplicação (B). Aspecto da lesão no tecido subcutâneo (C) e do material retirado do centro dessa lesão (D).

5.3.1.3. Microesferas de quitosana:

Já nos animais inoculados com as Microesferas de Quitosana, notou-se a presença de pequeno nódulo no local de aplicação dessa formulação. Durante a necropsia do dia 15, esse nódulo apresentou-se delimitado por cápsula fibrosa, circundado por pequena área de hemorragia (Fig. 19-C e 19-C'). Quando incisado, o nódulo apresentou um material branco e friável em seu interior (quitosana). Embora tenha reduzido consideravelmente de tamanho, o nódulo contendo quitosana

foi observado mesmo após 60 dias de experimentação, assim como a presença de pequena hemorragia ao seu redor. Aos 90 dias após a inoculação, uma pequena fibrose foi observada no local onde as microesferas de quitosana foram inoculadas (vide evolução da lesão na Tab. 4).

5.3.1.4. Implantes de quitosana

Nos animais onde foram inseridos os implantes de quitosana, logo após a implantação houve um aumento da área (1,6 cm de diâmetro) causado pela própria

presença do implante. Aos 15 dias após a implantação, observou-se à inspeção um nódulo bem delimitado de cerca de 2 cm de diâmetro (Fig.19-D), liso à palpação. À necropsia, observou-se um nódulo circundado por uma área de fibroplasia envolvendo o tecido subcutâneo e a pele (Fig. 19-D'), além de áreas de hemorragia moderada. Por meio da análise microscópica das lesões (Fig.19), pode-se notar que o implante permaneceu na lesão mesmo após 60 dias de implantação (vide evolução da lesão na Tab. 4).

5.3.2. Análise Microscópica

Quinze dias após a inoculação da microemulsão, no local de inoculação foi observado um intenso infiltrado granulomatoso (Fig.21-A) caracterizado por macrófagos epitelióides e células gigantes multinucleadas (Fig.21-B e Fig. 21-C), além de fibroplasia acentuada (Fig.21-D). Áreas multifocais de material fracamente basofílico associado à necrose caseosa foram observadas no interior deste infiltrado (provavelmente a microemulsão). A evolução dessa lesão está descrita na Tab.4.

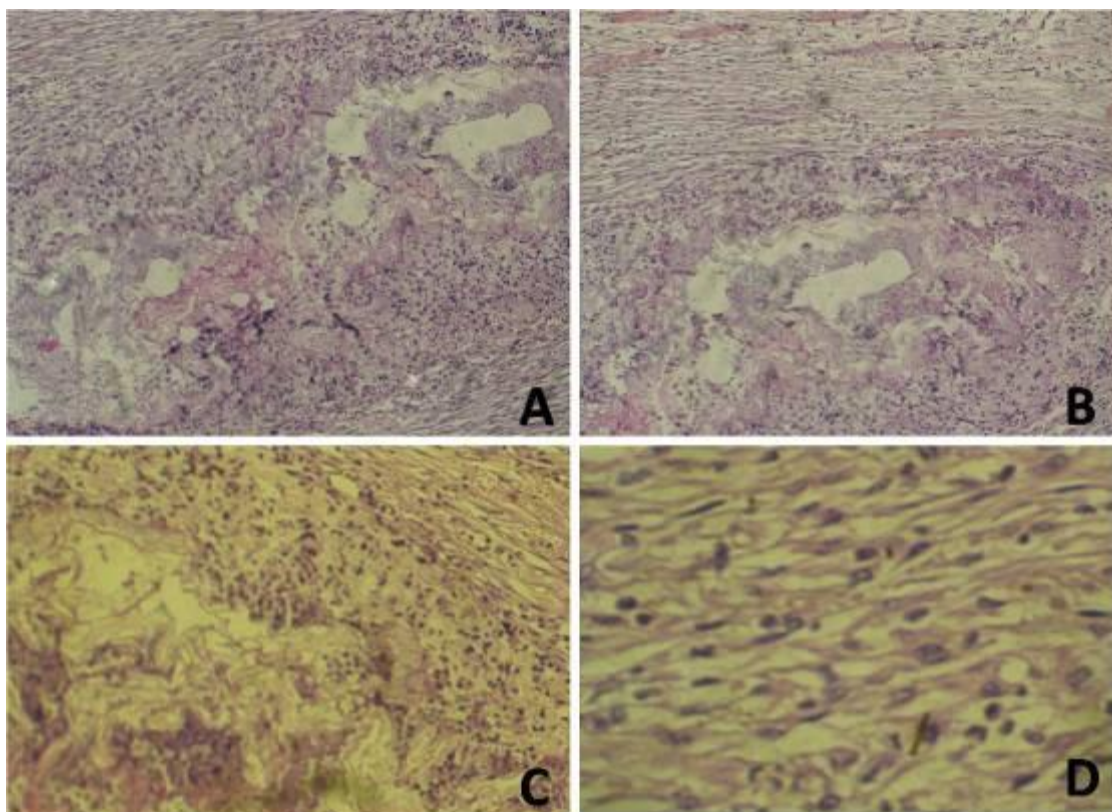


Figura 21- Corte histológico da área onde foi inoculada a Microemulsão, 15 dias após a inoculação. (A) e (B) Intenso infiltrado inflamatório circundado por fibroplasia (aumento 100X), (C) Aspecto basofílico do material encontrado no centro desse infiltrado (aumento 100X). (D) Fibroplasia acentuada (aumento 400X).

No local de inoculação da Emulsão Múltipla, foi observado extenso infiltrado inflamatório tipo piogranulomatoso (Fig.22-A) caracterizado por macrófagos epitelióides, neutrófilos e alguns linfócitos delimitados por fibroplasia (Fig.22-B), 15 dias após a inoculação. Na região central deste infiltrado observou-se um material fracamente eosinofílico associado à intensa

hemorragia (Fig.22-C e Fig.22-D). Acentuada hiperqueratose ortoqueratótica em ninhos regulares, distribuída difusamente e com degeneração balonosa, de acentuada a moderada, também foi observada, além de colagenólise difusa. Não houve formação de cápsula fibrosa circundando a Emulsão Múltipla. O estudo da evolução desta lesão não foi realizado.

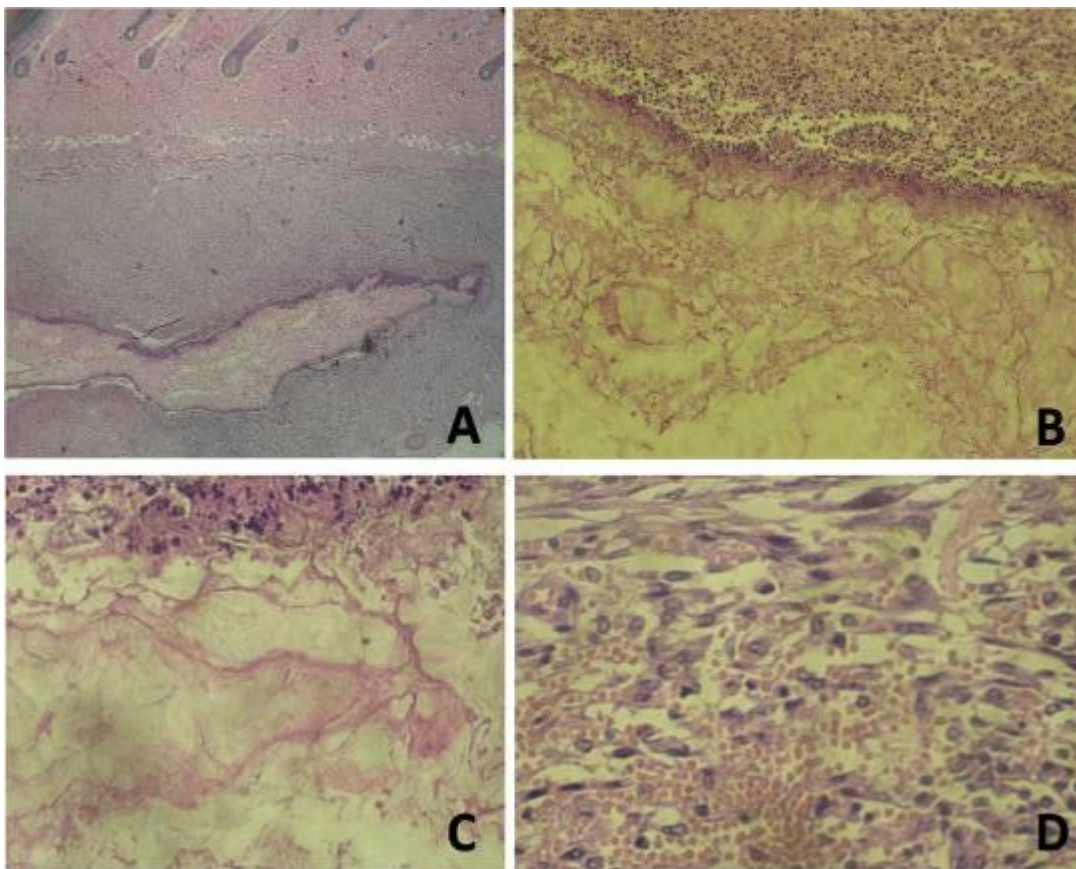


Figura 22- Corte histológico da área onde foi inoculada a Emulsão Múltipla, 15 dias após a inoculação. (A) extenso infiltrado inflamatório piogranulomatoso circundando material eosinofílico (aumento de 40X), (B) e (C) Aspecto fracamente eosinofílico do material (aumento de 100X) e (D) Intensa hemorragia (aumento de 400X).

No local de inoculação das microesferas de quitosana foram observadas áreas multifocais de intenso infiltrado inflamatório do tipo piogranulomatoso (Fig. 23-A) delimitados por fibroplasia (Fig. 23-B e Fig. 23-D), 15 dias após a inoculação.

Presença de material fortemente eosinofílico amorfo com aspecto granular no centro do infiltrado e intrahistiocitário (Fig.23-C), provavelmente as microesferas de quitosana. A evolução dessa lesão está descrita na Tab.4.

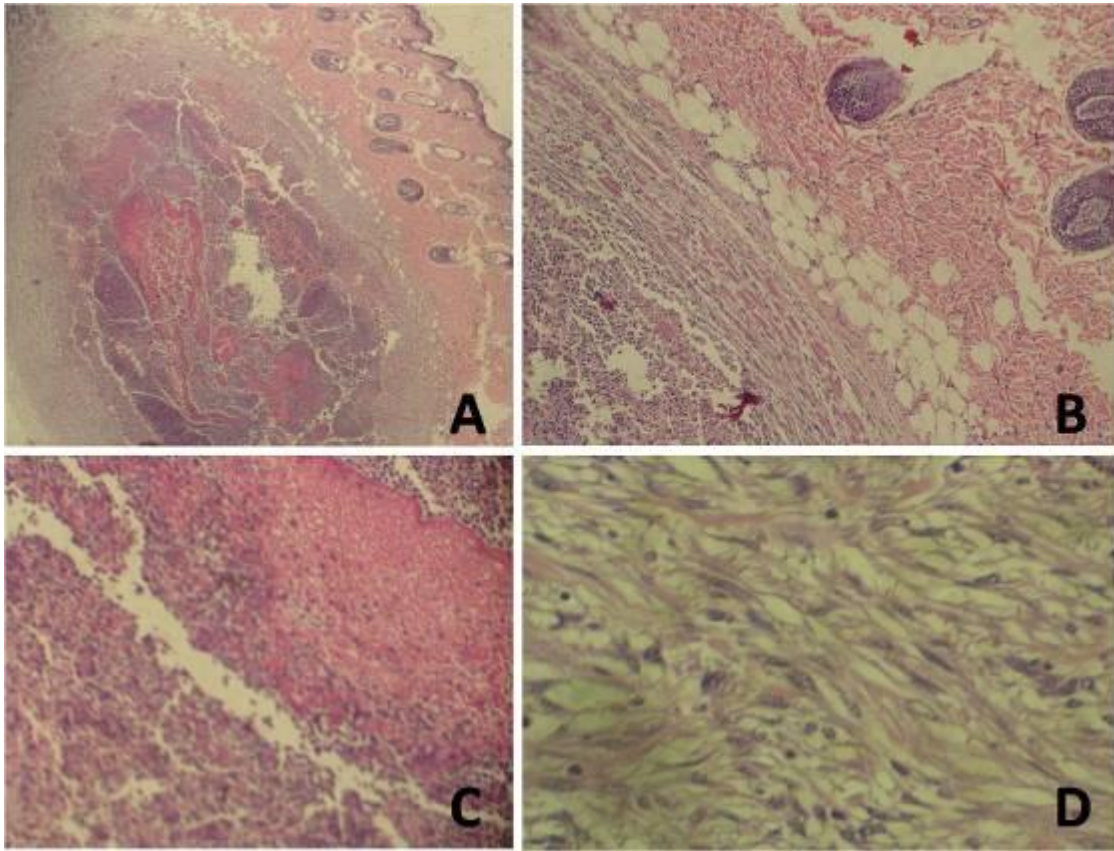


Figura 23- Corte histológico de um nódulo causado pela inoculação das Microesferas de Quitosana, 15 dias após a inoculação. (A) Corte em pequeno aumento mostrando toda estrutura do nódulo (aumento de 40X), (B) Intenso infiltrato inflamatório do tipo piogranulomatoso delimitado por um cápsula fibrosa (aumento de 100X), (C) Aspecto granular e amorfo do material encontrado no centro do infiltrado, de coloração fortemente eosinofílica (aumento de 100X) e (D) fibroplasia delimitando o infiltrado descrito (aumento de 400X).

Após 15 dias da implantação cirúrgica dos implantes de quitosana, uma extensa estrutura nodular foi observada no subcutâneo, apresentando necrose central (Fig.24-A), delimitado por espessa camada de fibroplasia e infiltrado linfocitário, macrófago e de células gigantes. Material

intensamente eosinofílico sólido e linear (implante de quitosana) também foi observado nestas áreas sendo delimitado por grande quantidade de neutrófilos degenerados, macrófagos espumosos e linfócitos (Fig. 24-B e 24-C). A evolução dessa lesão está descrita na Tab. 4.

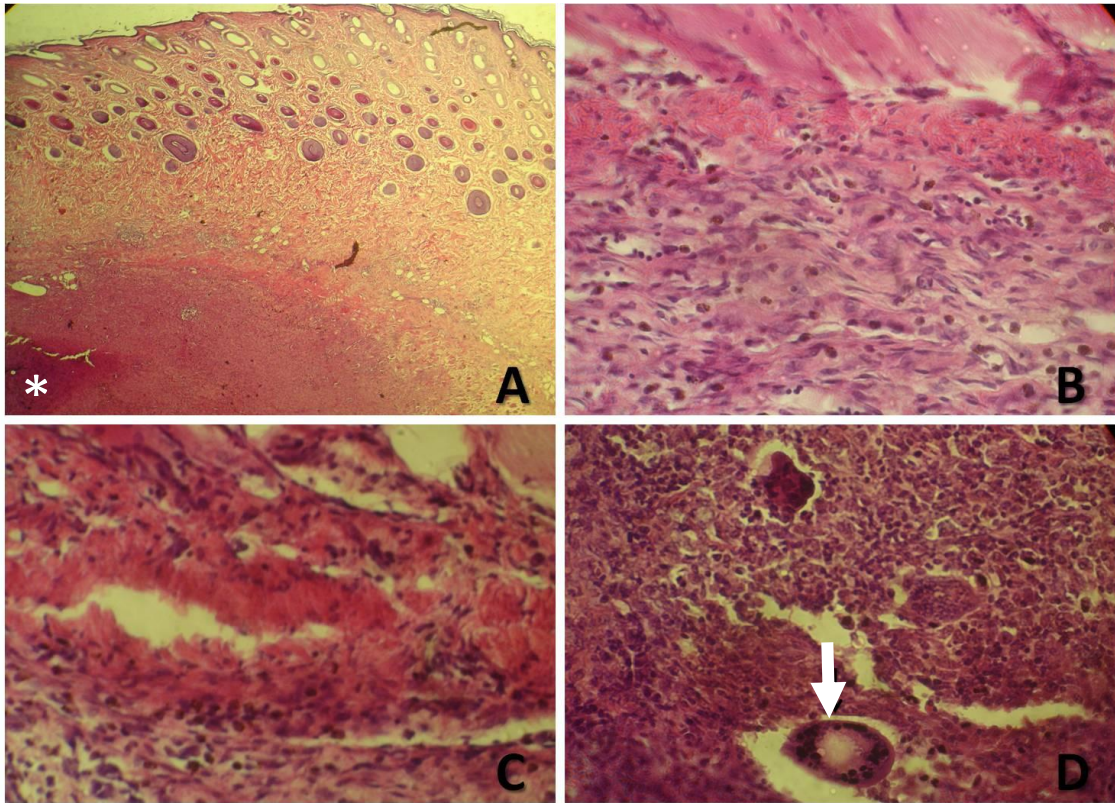


Figura 24- Corte histológico de um nódulo causado pela inoculação de um Implante de Quitosana, 15 dias após a inoculação. (A) Corte em pequeno aumento mostrando a estrutura do nódulo (aumento de 40X) com área de necrose caseosa central(*), (B) extensa camada de fibroplasia delimitando material intensamente eosinofílico (aumento de 100X), (C) Aspecto do material intensamente eosinofílico, sólido e linear encontrado no centro do infiltrado (aumento de 100X) e (D) presença de células gigantes (seta) e macrófagos espumosos (aumento de 400X).

Tabela 4- Evolução das lesões causadas pela inoculação dos adjuvantes formulados:

Fórmula	Tempo em Dias			
	15	30	60	90
MICROEMULSÃO	<p>Inspeção e palpação: pequenas áreas lisas e macias à palpação, pouco delimitadas e quase imperceptíveis a inspeção.</p> <p>Necropsia: áreas estavam situadas no tecido subcutâneo, apresentando aspecto fibroso.</p> <p>Histopatologia: intenso infiltrado granulomatoso caracterizado por macrófagos epitelióides e células gigantes multinucleadas, além de fibroplasia acentuada. Áreas multifocais de material fracamente basofílico (provavelmente a microemulsão) associado à necrose no interior deste infiltrado.</p>	<p>Inspeção, palpação e necropsia: Nenhuma lesão macroscópica.</p> <p>Histopatologia: infiltrado granulomatoso (mas com ausência do material descrito anteriormente) circundado por fibroplasia moderada.</p>	<p>Inspeção, palpação e necropsia: Nenhuma lesão macroscópica.</p> <p>Histopatologia: Ausência de reação inflamatória tissular no fragmento amostrado.</p>	<p>Inspeção, palpação e necropsia: Nenhuma lesão macroscópica.</p> <p>Histopatologia: Ausência de reação inflamatória tissular no fragmento amostrado.</p>
MICROESFERAS DE QUITOSANA	<p>Inspeção e palpação: presença de pequeno nódulo não bem delimitado.</p> <p>Necropsia: nódulo apresentou-se delimitado por cápsula fibrosa, circundado por pequena área de hemorragia (tamanho: cerca de 1,0 X 0,7 X 0,7cm). Quando incisado, o nódulo apresentou um material branco e friável em seu interior (quitosana).</p> <p>Histopatologia: áreas multifocais de intenso infiltrado inflamatório do tipo piogranulomatoso delimitados por fibroplasia. Presença de material fortemente eosinofílico amorfo com aspecto granular no centro do infiltrado e intrahistiocitário.</p>	<p>Inspeção e palpação: presença de pequeno nódulo de cerca de 0,8 cm de diâmetro.</p> <p>Necropsia: nódulo apresentou-se delimitado por cápsula fibrosa, circundado por pequena área de hemorragia (tamanho: cerca de 0,8 X 0,7 X 0,5cm). Quando incisado, o nódulo apresentou um material branco e friável em seu interior (quitosana).</p> <p>Histopatologia: áreas multifocais de intenso infiltrado inflamatório do tipo piogranulomatoso delimitados por fibroplasia. Presença de material fortemente eosinofílico amorfo com aspecto granular no centro do infiltrado.</p>	<p>Inspeção e palpação: presença de nódulo muito pequeno e duro de 0,6 cm de diâmetro.</p> <p>Necropsia: nódulo apresentou-se delimitado por cápsula fibrosa, circundado por pequena área de hemorragia (tamanho: cerca de 0,6 X 0,6 X 0,5cm).</p> <p>Histopatologia: áreas multifocais de infiltrado inflamatório do tipo piogranulomatoso delimitados por fibroplasia.</p>	<p>Inspeção e palpação: nódulo muito pequeno e duro de 0,4 cm diâmetro</p> <p>Necropsia: nódulo fibroso (tamanho: cerca de 0,4 X 0,4 X 0,3cm).</p> <p>Histopatologia: Área de fibroplasia. Ausência de reação inflamatória tissular no fragmento amostrado</p>

IMPLANTE DE QUITOSANA	<p>Inspeção e palpação: Nódulo bem delimitado de 2 cm de diâmetro, liso.</p> <p>Necropsia: Nódulo no subcutâneo. Intensa fibroplasia. Focos de hemorragia.</p> <p>Histopatologia: Extensa estrutura nodular com necrose caseosa central, delimitado por espessa camada de fibroplasia e infiltrado linfocitário, macrófago e de células gigantes. Material intensamente eosinofílico sólido e linear (implante de quitosana), delimitado por grande quantidade de neutrófilos degenerados, macrófagos espumosos e linfócitos.</p>	<p>Inspeção e palpação: Nódulo de 1,3 cm de diâmetro, liso.</p> <p>Necropsia: Nódulo no subcutâneo com fibroplasia. Focos de hemorragia.</p> <p>Histopatologia: Estrutura nodular delimitada por espessa camada de fibroplasia e infiltrado linfocitário, macrófago e de células gigantes contendo material intensamente eosinofílico sólido e linear (implante de quitosana).</p>	<p>Inspeção e palpação: Nódulo de 1,0 cm, liso.</p> <p>Necropsia: Nódulo no subcutâneo com fibroplasia. Focos de hemorragia.</p> <p>Histopatologia: Estrutura nodular delimitada por fibroplasia e infiltrado linfocitário, principalmente perivascular que se estende para o tecido conjuntivo adjacente</p>	Necropsia não realizada devido à morte do animal.
EMULSÃO MÚLTIPLA	<p>Inspeção e palpação: extenso nódulo bem delimitado, rugoso e duro. Posterior ulceração do nódulo.</p> <p>Necropsia: área de extensa hemorragia no tecido subcutâneo, com a presença de uma grande massa branco-amarelada, firme e sem delimitação por cápsula fibrosa.</p> <p>Histopatologia: Extenso infiltrado inflamatório tipo piogranulomatoso caracterizado por macrófagos epitelióides, neutrófilos e alguns linfócitos delimitados por fibroplasia. Material fracamente eosinofílico associado à intensa hemorragia no centro do infiltrado. Acentuada hiperqueratose ortoqueratótica em ninhos regulares e distribuída difusamente com degeneração balonosa de acentuada a moderada, além de colagenólise difusa.</p>	Experimento cancelado	Experimento cancelado	Experimento cancelado

5.4. Obtenção das VLP do PVS

5.4.1. Padronização da PCR

As condições nas quais a PCR foi padronizada estão descritas na Tab. 5 e a eletroforese confirmando a amplificação do fragmento está documentada na Fig. 25.

A amplificação do gene da proteína VP2 do PVS foi confirmada através do sequenciamento do produto amplificado pela PCR padronizada.

Tabela 5 -Padronização da PCR para amplificação do gene VP2 do Parvovirus Suíno

Condições da PCR		
94°C	2 minutos	1 ciclo
94°C	1 minuto	
55°C	1 minuto	30 ciclos
72°C	2 minutos	
72°C	10 minutos	1 ciclo
4°C	∞	∞

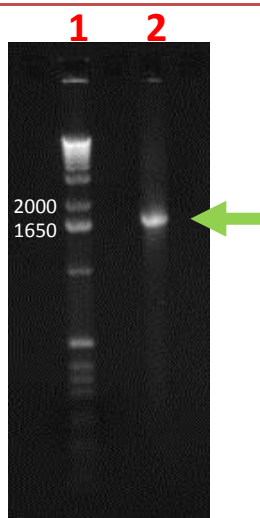


Figura 25- Foto de gel de agarose 1% mostrando eletroforese contendo o gene da VP2 amplificado. Canaleta 1 contendo padrão (1kb Plus DNA Ladder, Invitrogen). Canaleta 2 contendo fragmento de DNA com tamanho entre 1650 e 2000pb (VP2=1740pb + seqüências alvo das enzimas de restrição).

5.4.2. Clonagem do gene VP2 nos vetores pGem T-easy® e pFastBac Dual® e obtenção dos bacmídeos e baculovírus recombinantes

Para confirmação da clonagem do gene VP2 no plasmídeo pGem-T Easy® foi feita

uma digestão com *EcoRI*, gerando a liberação do plasmídeo (aproximadamente 3000 pb) e dois fragmentos da VP2 (aproximadamente 970pb e 790 pb), segundo esquematizado na Fig. 26-A e B. Esta clonagem foi confirmada pela eletroforese demonstrada na Fig. 26-C.

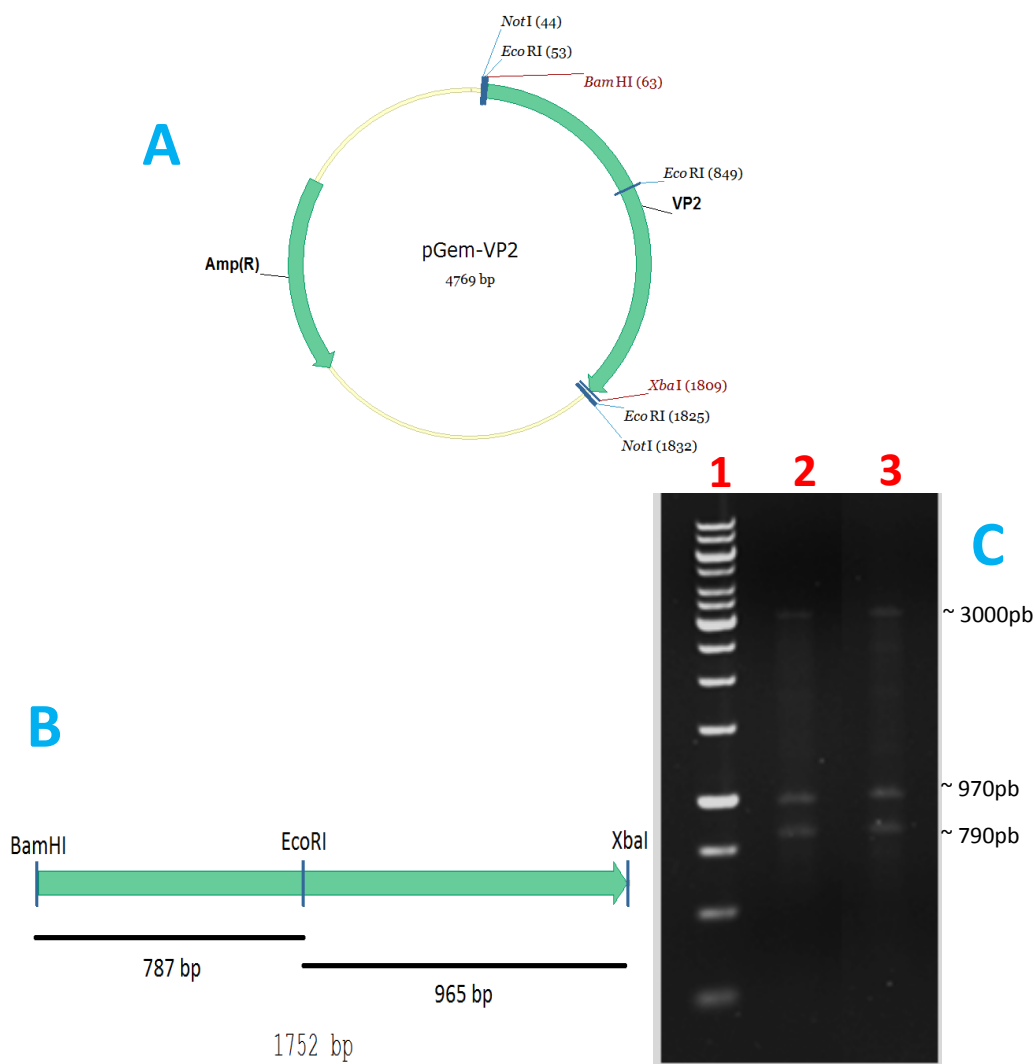


Figura 26- Confirmação da clonagem do gene da proteína VP2 no plasmídeo pGem-T Easy. (A) Esquema demonstrando o plasmídeo gerado, (B) Esquema demonstrando a digestão com *EcoRI* e o tamanho dos fragmentos resultantes da digestão e (C) Foto de gel de agarose 1% contendo fragmentos de aproximadamente 970 e 790pb (VP2 digerida) e 3000pb (plasmídeo). Primeira canaleta com padrão (1kb DNA Ladder, Fermentas). Esquema feito através do uso do programa Vector NTi (Invitrogen).

A confirmação da clonagem do gene VP2 no plasmídeo pFastBac Dual® foi demonstrada através do gel de eletroforese da Fig. 27. Para esta confirmação foram realizadas três digestões enzimáticas. A primeira digestão foi feita utilizando a enzima *EcoRI*, gerando um fragmento de 5973pb e outro de 976pb (Fig. 27-A). A segunda foi feita utilizando a enzima *HindIII*, gerando dois fragmentos (5663pb e 1286pb) (Fig. 27-B). A terceira utilizou-se a enzima *NsiI*, gerando três fragmentos (5313pb, 963pb e 673pb), segundo Fig. 27-C.

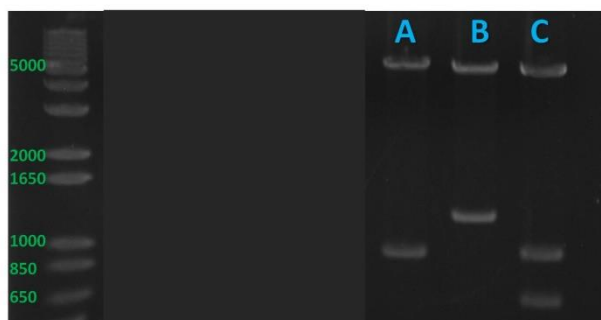


Figura 27- Confirmação da clonagem do gene da proteína VP2 no plasmídeo pFastBac Dual®. Foto de gel de agarose 1% contendo fragmentos de aproximadamente (A) 5973pb e 976pb, gerados após a digestão com *EcoRI*, (B) 5663pb e 1286pb, gerados após a digestão com *HindIII* e (C) 5313pb, 963pb e 673pb, gerados pela digestão com *NsiI*. Primeira canaleta com padrão (1kb Plus DNA Ladder, Invitrogen).

Após a transformação do plasmídeo pFastBacDual-VP2 em célula *E. coli* DH 10 Bac® (Invitrogen™), o bacmídeo

recombinante foi obtido por transposição, que foi confirmada através de PCR de suas colônias (Fig.28).

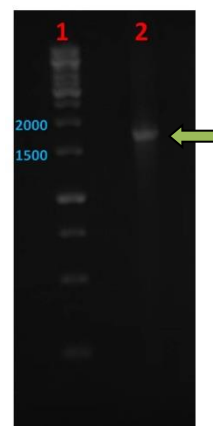


Figura 28- Confirmação da transposição ocorrida dentro da bactéria *E. coli* DH 10 Bac®. Foto de gel de agarose 1% contendo (1) padrão de massa molecular (Gene Ruler 1kb, ready-to-use, Fermentas) e (2) fragmento de cerca de 1740pb gerado após PCR de uma das colônias de *E. coli* DH 10 Bac® selecionada após transformação do plasmídeo pFastBacDual-VP2.

5.4.3. Transfecção das células TN5-B com o baculovírus recombinante e análise de proteínas expressa por estas células.

Após 3 a 5 dias da transfecção das células TN5-B pelo DNA do baculovírus recombinante, foi observado efeito citopático nas placas de cultivo (Fig.29). O sobrenadante dessas células foi coletado, titulado e utilizado para infectar novas placas de cultivo de TN5-B, sendo utilizado como vírus estoque (título de 2048UHA).

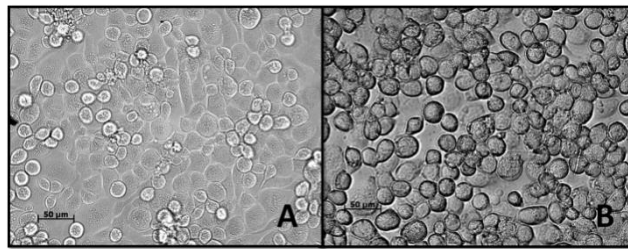


Figura 29- Células TN5-B (A) não transfectadas e (B) 72 horas após transfecção, apresentando efeito citopático (células mais arredondadas, em menor número, não aderidas à placa e com núcleos hipertrofiados).

O extrato das células TN5-B foi submetido a um SDS-PAGE para análise de suas proteínas (Fig.30). Essa eletroforese

demonstrou que uma proteína de pouco mais de 60KDa estava sendo expressa nas células infectadas, o que não ocorria nas células não infectadas.

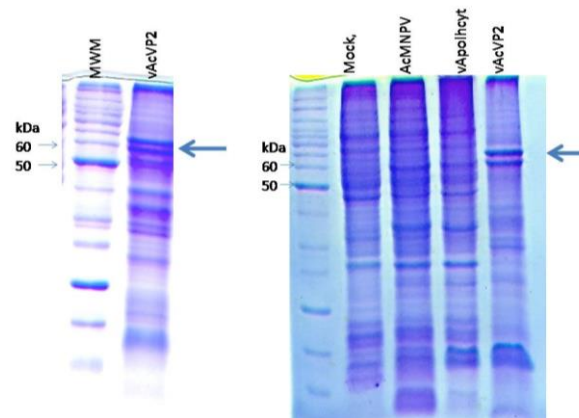


Figura 30- Análise de expressão de proteínas pelas células TN5-B transfectadas com o baculovírus recombinante VAcVP2. Foto de gel de poliacrilamida 12% mostrando a expressão de uma proteína de pouco mais de 60KDa por estas células (vACVP2). Esta proteína não estava sendo expressa por células TN5-B não infectadas (Mock) ou infectadas por outros baculovírus que não o recombinante (AcMNPV e vApolhcyt).

A avaliação das células TN5-B infectadas através do uso de microscopia eletrônica mostrou grande quantidade de proteínas no citoplasma destas células após 72 horas de infecção, assim como partículas de VP2 “montadas”, formando as VLP (Fig.31). Foi demonstrado que estas VLP

mimetizam os virions autênticos, com 25nm de tamanho, similar morfologia e idêntica atividade hemaglutinante com o PVS ativo.

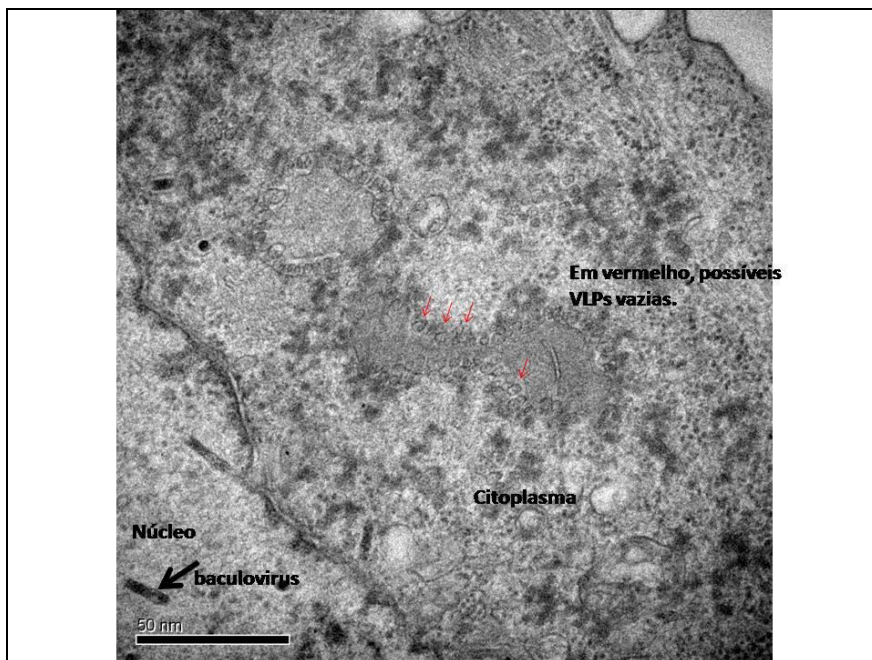
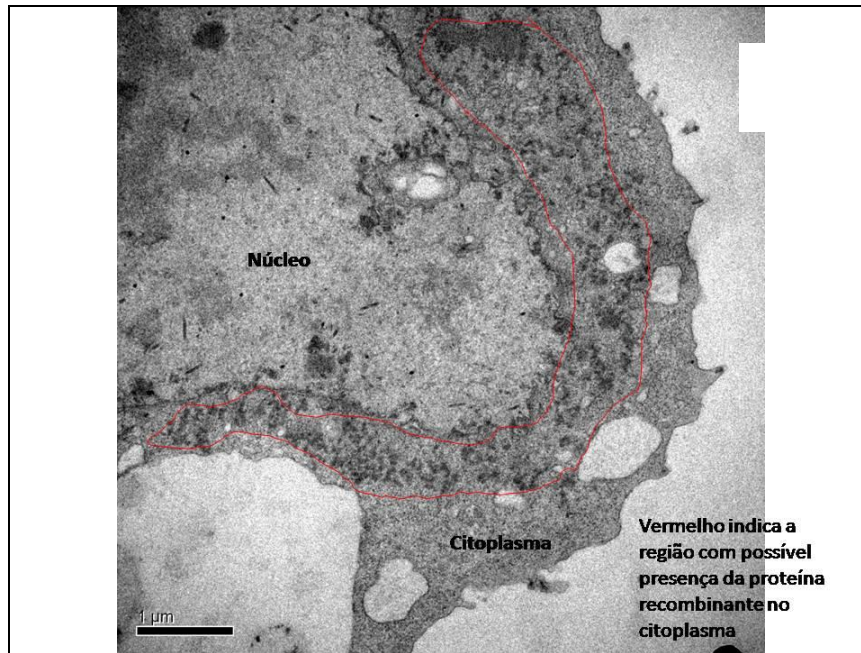


Figura 31- Foto de microscopia eletrônica mostrando células TN5-B após 72 horas de infecção com o vírus recombinante AcVP2.

5.5. Obtenção das vacinas

5.5.1. Elaboração da vacina aquosa:

A vacina preparada à base de hidróxido de alumínio apresentou aspecto turvo, semelhante ao do gel da mesma substância utilizado em seu preparo. A coloração rósea se deu pela presença do meio de cultivo (MEM) onde estava suspenso o PVS (Fig. 32-1).

5.5.2. Elaboração da vacina oleosa a base de emulsão O/A:

A vacina contendo Emulsigen® apresentou aspecto branco leitoso (Fig. 32-2), com glóbulos inferiores a 1µm quando observados ao microscópio ótico em aumento de 1000X.

5.5.3. Elaboração de vacinas a base de microesferas e implantes de quitosana:

As microesferas de quitosana contendo o PVS adsorvido apresentavam as mesmas características das microesferas contendo somente a solução de NaCl 0,9%. Para realização do teste de potência, estas também foram ressuspensas em PBS. As microesferas contendo o vírus adsorvido também não se dissolviam bem na solução, ficando sobre a forma de particulado. Essa característica dificultou, mas não impossibilitou a injeção do inóculo. A suspensão apresentou coloração turva, como demonstrado na Fig. 32-3.

5.5.3.1. Verificação do índice de adsorção viral às partículas de quitosana:

Após o preparo da vacina contendo as microesferas de quitosana foi verificado o quanto da suspensão viral foi adsorvida pelas partículas de quitosana. Os resultados estão descritos na Tab.6.

Tabela 6- Resultados do teste de Hemoaglutinação e da Dosagem de Proteínas realizados antes e depois da adsorção da suspensão viral às partículas de quitosana:

	Antes da adsorção		Após adsorção	
HA	1024 UHA	10 (Log 2)	256 UHA	8 (Log 2)
Dosagem proteínas	1,01 mg/ml		0,87mg/ml	

5.5.4. Elaboração de vacinas a base de microemulsão:

Com a padronização da formulação da microemulsão contendo NaCl 0,9% como fase aquosa, o próximo passo seria descobrir se a microemulsão também se formaria quando a solução simples de NaCl 0,9% fosse substituída pela suspensão viral, que é muito mais complexa e não é

purificada. Uma suspensão celular foi adicionada à formulação como fase aquosa antes de se testar a suspensão viral propriamente dita. Após a comprovação da formação da microemulsão contendo a suspensão celular em vez de NaCl 0,9%, uma vacina foi produzida pela simples substituição da fase aquosa por suspensão viral. Após o preparo, a vacina apresentou-se transparente e límpida (Fig. 32-4).



Figura 32- Aspecto visual das vacinas inativadas obtidas: (1) hidróxido de alumínio, (2) emulsão O/A, (3) microesferas de quitosana e (4) microemulsão.

5.5.5. Elaboração das vacinas de subunidades:

A vacina preparada à base de hidróxido de alumínio apresentou aspecto turvo, semelhante ao do gel da mesma substância utilizado em seu preparo. A vacina de subunidades que não continha adjuvante e a que continha microemulsão, apresentaram o aspecto mostrado na Fig.33.

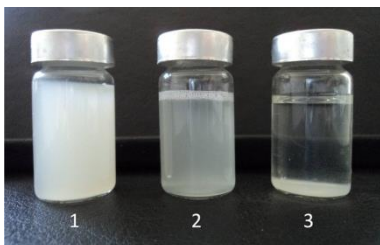


Figura 33- Aspecto visual das vacinas de subunidades obtidas: (1) hidróxido de alumínio, (2) microemulsão e (3) sem adjuvante.

5.6. Testes:

5.6.1. Estabilidade

Todas as formulações desenvolvidas foram estáveis por sete meses à 4°C e à

temperatura ambiente, quando o teste foi então finalizado.

5.6.2. Esterilidade

Imediatamente após a adição das amostras contendo a emulsão O/A e a emulsão múltipla nos tubos com caldo tioglicolato, o meio tornou-se turvo. Embora a turvação devesse apenas à natureza das emulsões, esta podia mascarar a observação de um possível crescimento microbiano. Por essa razão, a cada 24 horas, durante sete dias após o início da incubação, as amostras que apresentaram turvação imediata à inoculação em meio tioglicolato eram novamente transferidas para outro meio tioglicolato. Durante os sete dias que sucederam o dia da última transferência realizada, em nenhum dos tubos contendo a emulsão O/A e a emulsão múltipla foi observado crescimento de microorganismos.

O meio tioglicolato onde foram adicionadas as microesferas de quitosana apresentou, imediatamente à adição, aspecto granuloso, evidenciado pela forma particulada da microesfera. A pequena turvação causada pela presença desses particulados não podia ser confundida com uma eventual turvação por crescimento bacteriano ou fúngico.

Após 24 horas do início do teste, o meio do tubo que continha a vacina produzida a partir da microemulsão apresentou-se turvo, evidenciando a contaminação da partida. Uma nova partida da vacina foi feita e novo teste de esterilidade foi realizado. Após os 14 dias de teste, nenhum dos meios contendo as partidas das vacinas produzidas e nenhum dos meios contendo os adjuvantes a serem inoculados no teste de inocuidade apresentou turvação, demonstrando que estavam livres de qualquer contaminante microbiológico.

5.6.3. Potência em cobaias:

Durante o teste de potência, possíveis lesões causadas pela inoculação das vacinas foram avaliadas e descritas no quadro 4. Os

títulos de anticorpos anti-parvovírus suíno detectados no dia zero, 14 e 28 após as vacinações estão mostrados na Tab. 7 e a diferença estatística entre eles está descrita no quadro 5.

Quadro 4- Lesões decorrentes da aplicação das vacinas.

Vacina		Lesões observadas (Lesões/Total)	Descrição da lesão
Controle		0/6	Não houve lesão
Comercial		0/6	Não houve lesão
Inativada	Sem adjuvante	0/6	Não houve lesão
	Hidróxido de alumínio	1/6	Nódulo avermelhado e bem delimitado, de aproximadamente 0,9 cm de diâmetro, sem ulceração.
	Emulsão óleo/água	2/6	Pequenos nódulos ulcerados, de cerca de 0,5cm de diâmetro, contendo áreas de hemorragia e leve extravasamento de material (emulsão).
	Microesferas de quitosana	1/6	Nódulo avermelhado e bem delimitado, cerca de 0,5cm de diâmetro, sem ulceração.
	Implantes de quitosana	0/6*	* somente a lesão causada pela incisão, associada ao edema.
	Microemulsão	0/6	Não houve lesão
Subunidades	Sem adjuvante	0/6	Não houve lesão
	Hidróxido de alumínio	4/6	Nódulos avermelhados e bem delimitados, (em média 1 cm de diâmetro). Dois deles com ulceração.
	Microemulsão	0/6	Não houve lesão

Tabela 7- Títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação encontrados nos soros dos animais imunizados com as vacinas formuladas.

GRUPO	Vacina	Cobaias	Dia 0 (UHA)	Log 2	Mediana	Dia 14 (UHA)	Log 2	Mediana	Dia 28 (UHA)	Log 2	Mediana
1	Inativada + Hidróxido de alumínio	1	16*	4	4	128	7	9	2048	11	12
		2	32	5		512	9		4096	12	
		3	16	4		512	9		4096	12	
		4	16	4		1024	10		4096	12	
		5	32	5		512	9		4096	12	
		6	16	4		1024	10		2048	11	
2	Inativada + Emulsão óleo/água	1	16	4	4,5	256	8	9	256	8	12
		2	32	5		1024	10		>8192	13	
		3	32	5		256	8		512	9	
		4	8	3		512	9		2048	11	
		5	16	4		1024	10		>8192	13	
		6	32	5		512	9		>8192	13	
3	Inativada + Microesferas De Quitosana	1	0	0	4,5	128	7	7	512	9	11
		2	8	3		512	9		2048	11	
		3	32	5		128	7		2048	11	
		4	32	5		128	7		>8192	13	
		5	32	5		256	8		2048	11	
		6	16	4		128	7		256	8	
4	Inativada + Implante de Quitosana	1	16	4	4,0	2048	11	9,5	512	9	9,5
		2	32	5		512	9		1024	10	
		3	16	4		512	9		512	9	
		4	16	4		2048	11		1024	10	
		5	8	3		512	9		512	9	
		6	32	5		1024	10		1024	10	
5	Inativada + Micro emulsão	1	8	3	3,5	2048	11	8,5	256	8	11
		2	32	5		256	8		2048	11	
		3	16	4		512	9		2048	11	
		4	8	3		256	8		1024	10	
		5	8	3		128	7		2048	11	
		6	32	5		1024	10		2048	11	
6	Inativada sem adjuvante	1	16	4	4	64	6	5,5	64	6	6
		2	16	4		32	5		128	7	
		3	32	5		64	6		64	6	
		4	32	5		64	6		64	6	
		5	16	4		32	5		128	7	
		6	8	3		32	5		64	6	
7	Comercial	1	16	4	4	512	9	6,5	512	9	7
		2	16	4		64	6		128	7	
		3	32	5		64	6		128	7	
		4	16	4		64	6		256	8	
		5	32	5		128	7		128	7	
		6	16	4		128	7		Morte	-	
8	Controle negativo	1	16	4	4	16	4	4,5	16	4	4
		2	16	4		64	6		16	4	
		3	32	5		32	5		32	5	
		4	16	4		32	5		16	4	
		5	32	5		16	4		32	5	
		6	16	4		16	4		16	4	
9	Subunidades + hidróxido de alumínio	1	32	5	4,5	1028	10	9,5	4096	12	12
		2	16	4		512	9		4096	12	
		3	32	5		1028	10		2048	11	
		4	32	5		512	9		4096	12	
		5	16	4		1028	10		1024	10	
		6	8	3		512	9		4096	12	
10	Subunidade + microemulsão	1	16	4	4	512	9	9	1024	10	10,5
		2	16	4		512	9		1024	10	
		3	16	4		512	9		4096	12	
		4	16	4		512	9		2048	11	
		5	32	5		128	7		2048	11	
		6	16	4		128	7		1024	10	
11	Subunidades sem adjuvante	1	32	5	4,5	512	9	8,5	1024	10	10
		2	16	4		512	9		512	9	
		3	32	5		256	8		1024	10	
		4	16	4		128	7		1024	10	
		5	32	5		512	9		2048	11	
		6	16	4		128	7		1024	10	

* Foram considerados negativos os soros contendo titulação ≤ 40 , segundo LOBATO, 1990.

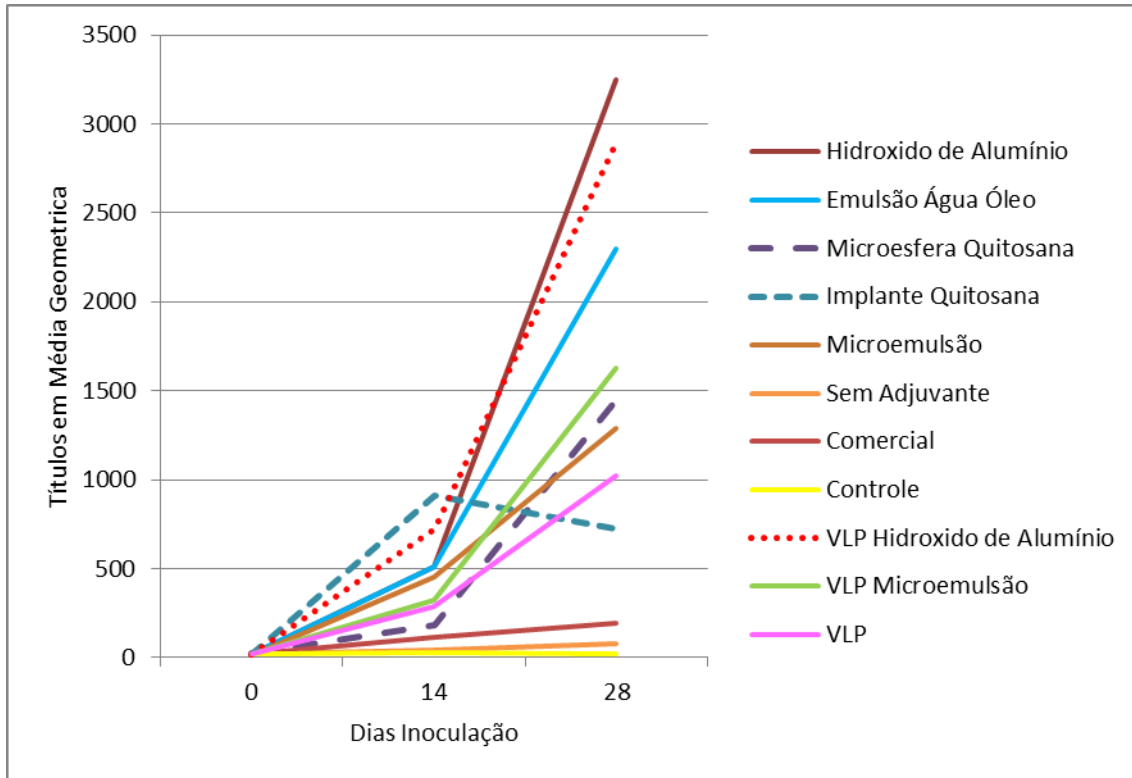


Figura 34- Médias geométricas dos títulos de anticorpos anti-parvovirus suíno frente às diversas formulações de vacina.

Quadro 5- Diferença estatística dos resultados do teste de potência entre as diversas formulações de vacinas para parvovirus suíno, considerando significativos os valores de p<0,05.

Formulações		Vacina inativada							VLP			
		Hidróxido de alumínio	Emulsão óleo/água	Microesferas de quitosana	Implante de quitosana	Microemulsão	Sem adjuvante	Comercial	Controle	Hidróxido de alumínio	Microemulsão	Sem adjuvante
Vacina inativada	Hidróxido de alumínio		NS	NS	S*	S	S	S	S	NS	S	S
	Emulsão óleo/água			NS	NS	NS	S	S	S	NS	NS	NS
	Microesferas quitosana				NS	NS	S	S	S	NS	NS	NS
	Implante de quitosana					NS	S	S	S	S	NS	NS
	Microemulsão						S	S	S	NS	NS	NS
	Sem adjuvante							S	S	S	S	S
	Comercial								S	S	S	S
VLP	Hidróxido de alumínio									NS	S	
	Microemulsão										NS	

*S= diferença significativa entre as vacinas analisadas/ NS= diferença não significativa entre as vacinas analisadas.

6. DISCUSSÃO

6.1. Obtenção do antígeno:

Atualmente as vacinas contra parvovirose suína são produzidas em linhagens de células estabelecidas. Depois da infecção, o parvovírus é isolado e inativado com agentes químicos. Estes processos são caros, laboriosos e perigosos porque necessitam de crescimento e manuseio de grandes quantidades de vírus infeccioso, além dos agentes inativantes serem altamente tóxicos. A β -propiolactona, por exemplo, usada nesse experimento e também em escala industrial, está na lista de substâncias perigosas e altamente perigosas (*Hazardous Substance List* e

Special Health Substance List) dos Estados Unidos. Ela é considerada carcinogênica, mutagênica, corrosiva e irritante, sendo responsável por queimaduras na pele e pulmões, além de danos aos rins e ao fígado a longo prazo (BOUTWELL et al, 2006).

A maior limitação à produção vacinal contra a parvovirose suína é a obtenção do antígeno propriamente dito, porque o parvovírus tem baixo crescimento *in vitro* (LOBATO, 1990). Isso está bem relatado na literatura como consequência do acúmulo de partículas incompletas, também denominadas partículas defectivas (RODHE III, 1978). Devido ao acúmulo dessas partículas defectivas, o título desse vírus sempre diminui à medida que

aumentamos a passagem das células infectadas, sendo de extrema dificuldade produzir amostras virais com altos títulos. Em nosso experimento, a obtenção do antígeno para fabricação das vacinas inativadas foi extremamente morosa, levando cerca de um ano para obtermos a quantidade necessária de vírus com altos títulos hemaglutinantes para produção de todas as vacinas, o que ocorreu só depois de conseguirmos purificá-lo por meio de diluições em ponto final a fim de reduzirmos o número de partículas defectivas por lote.

6.2. Desenvolvimento e formulação dos adjuvantes:

Questões como a facilidade, o tempo e o custo da produção, a facilidade de injetar o adjuvante (seringabilidade), sua metabolização, possíveis reações locais adversas consequentes a sua aplicação e sua capacidade de estimular o sistema imune devem ser avaliadas quando se desenvolve um novo adjuvante.

Durante o desenvolvimento e formulação dos adjuvantes deste experimento, não houve grande dificuldade no desenvolvimento das formulações de microemulsão, microsferas de quitosana e implantes de quitosana. Entretanto, alguns problemas foram encontrados enquanto desenvolvíamos a emulsão múltipla. Houve dificuldade em obter uma emulsão primária com os reagentes metabolizáveis disponíveis, além do grande tempo de agitação despendido para sua obtenção. Só uma formulação de emulsão múltipla foi estável utilizando os reagentes metabolizáveis, já que a vaselina não possui essa característica (vaselina só foi utilizada como teste, já que queríamos saber se o problema da não formação da emulsão múltipla era devido ao equipamento utilizado ou a formulação utilizada). Quando se fez a substituição do cloreto de

sódio 0,9%, utilizado na fase aquosa da emulsão primária, pela suspensão celular, a emulsão múltipla formada se tornava instável. Esta desestabilização do sistema ocorreu pelo acréscimo de várias substâncias contidas no meio MEM (aminoácidos, carboidratos, sais e vitaminas), além do soro fetal bovino, dos antibióticos e dos restos celulares, resultando em um aumento da osmolaridade da fase interna, tornando-a hipertônica em relação à fase externa, desestabilizando a emulsão múltipla. Existem relações sobre os ingredientes e concentrações, tempos e velocidades de agitação, além de temperatura de formação das emulsões mais indicados para o desenvolvimento das emulsões múltiplas. Entretanto, todas as vezes que estas emulsões múltiplas foram utilizadas como veículos ou adjuvantes, o que se incorporava na fase interna eram suspensões menos complexa que as incorporadas neste trabalho, geralmente substâncias puras como hormônios, antígenos purificados, entre outros (CUNHA e GONTIJO, 2000). Concluiu-se que a complexidade da suspensão viral a ser incorporada ao adjuvante desestabilizava o sistema, fato também observado por RENAULT (2002) quando trabalhou com os vírus da Diarréia Bovina a Vírus e da Rinotraqueíte Infecçiosa Bovina. Devido ao problema da estabilização da emulsão múltipla, esta não foi utilizada na produção de vacina contra o PVS.

6.3. Teste de inocuidade:

No estudo e desenvolvimento de formulações de adjuvantes deve-se levar em consideração a intensidade da resposta inflamatória e as possíveis lesões severas consequentes à sua aplicação. Potentes adjuvantes como o adjuvante de Freund, mesmo estimulando fortemente a resposta imune, não podem ser constituintes de vacinas comerciais por causarem grandes efeitos adversos nos animais inoculados. A

medida da espessura da pele no local de aplicação dos adjuvantes e a aferição da temperatura dos animais inoculados, assim como a observação de lesões locais pós-vacinais são parâmetros utilizados para análise da intensidade da resposta inflamatória. Conforme resultados encontrados, todos os adjuvantes formulados induziram a resposta inflamatória local, embora nenhum animal apresentasse febre (tendo como referência a temperatura normal de cobaias de 38 a 39,2°C, segundo VIANA, 2007). Com a análise das lesões macroscópicas, viu-se que com a inoculação da Emulsão Múltipla, uma reação inflamatória local bem mais intensa que a outras foi evidenciada, com a presença de uma extensa hemorragia. Além de causar dor e incômodo ao animal, podendo causar redução no ganho de peso e consequente perda econômica na possibilidade de, futuramente, ser usada na inoculação de animais de produção, esta reação intensa poderia ser o empecilho ao uso deste adjuvante em animais de produção por causa da depreciação da carcaça. Embora não tenha sido aprovado no teste de inocuidade em cobaias, este adjuvante poderá ser testado posteriormente em suínos com o intuito de avaliar as reações locais e sistêmicas após sua inoculação, já que em coelhos este adjuvante foi bem tolerado (MACEDO, 2004 e RENAULT, 2002), além de também não ser o responsável por reações adversas locais quando inoculado em ovelhas (PARKER, 1975).

6.4. Produção das partículas semelhantes a vírus (VLP-PVS):

A principal observação feita durante a produção das VLP foi a agilidade em implementar o sistema baculovírus na produção de antígenos protéicos. Além disso, o cultivo das células de inseto utilizadas para expressar esses antígenos é de fácil manuseio e de baixo custo,

utilizando meios de cultura menos complexos, sem a necessidade de adição de componentes de alto valor como o HEPES e sem necessitar também de equipamentos muito caros, como estufa de CO₂, para seu crescimento.

6.5. Produção vacinal:

Segundo os resultados registrados na Tab. 6, quase 90% das proteínas que pertenciam à suspensão viral não foram adsorvidos pela quitosana, fazendo com que a vacina produzida tivesse uma quantidade muito menor de vírus que as outras vacinas formuladas. Entretanto, estudos realizados anteriormente demonstraram que este é considerado um ótimo percentual de adsorção quando se utiliza este adjuvante*. Mais estudos sobre a capacidade de adsorção das microesferas de quitosana devem ser realizados no intuito de se aumentar a adsorção do PVS pela quitosana, a fim de se obter uma vacina contendo a maior quantidade de partículas virais possíveis/dose.

6.6. Avaliação da resposta imune humoral:

De todas as vacinas testadas, as que estimularam a maior produção de anticorpos foram as que continham o hidróxido de alumínio como adjuvante, tanto em se tratando de vacinas tradicionais quanto de vacinas de VLP. Vacinas contendo este adjuvante são muito estáveis, baratas e fáceis de produzir em larga escala. Entretanto, quando se trabalha com o parvovírus suíno, a vacina de subunidades possui grande vantagem por acelerar a obtenção do antígeno, que é extremamente laboriosa durante a produção da vacina inativada contra esse vírus. O problema em relação as vacinas contendo este adjuvante é o grande índice de reações adversas apresentadas quando inoculadas em suínos, sendo comum o aparecimento de dor,

edema e granulomas no local de sua aplicação, assim como febre e apatia. Em nosso experimento, cinco dos doze animais inoculados com formulações contendo esse adjuvante apresentaram reações locais pós-vacinais (Quadro 4).

A vacina comercial utilizada neste experimento era também aquosa, à base de hidróxido de alumínio. Entretanto, a discrepância nos valores dos títulos induzidos por esta vacina comercial e pela vacina contendo hidróxido de alumínio que foi formulada por nós, deveu-se, em tese, pela dificuldade em se produzir grandes quantidades de partículas virais com altos títulos hemaglutinantes também na indústria. Este teste foi realizado para tentar explicar porque animais vacinados com estas vacinas aquosas ainda apresentam a sintomatologia da parvovirose suína.

Outro ponto que demonstra a superioridade das vacinas de subunidades sobre as vacinas tradicionais, é que as vacinas inativadas têm necessariamente que estar conjugadas a um adjuvante, o que não ocorre com as vacinas de subunidades contendo VLP. A tabela 7 mostra que não houve grande aumento do título de anticorpos quando inoculou-se parvovirus suíno inativado sem adição de adjuvante em cobaias (título inicial de 16 para título final de 64, aumento de duas vezes), diferentemente da resposta estimulada pelas VLP também inoculadas sem adjuvante (título inicial de 16 para título final de 1024, aumento de seis vezes). Isso corrobora com ANTONIS et al (2006) que afirmou que pequenas quantidades de VLP, mesmo sem adjuvantes seriam capazes de estimular altos títulos de anticorpos. Note que estatisticamente não há diferença significativa entre os títulos de anticorpos estimulados por esta vacina de subunidades que não continha nenhum adjuvante e todas as outras contendo os adjuvantes emulsão óleo-água,

microemulsão, microesferas de quitosana e implantes de quitosana.

Também devem ser levadas em consideração mais outras duas vantagens da vacina de subunidades produzida neste experimento. Primeiramente, durante a clonagem do gene da VP2 no plasmídeo de expressão pFastBac Dual® utilizou-se somente um dos sítios de multiclonagem deste plasmídeo. Isso significa que se clonarmos outra sequência codificadora de uma proteína que poderá ser utilizada como imunógeno (outro vírus patogênico para suínos, por exemplo) no outro sítio disponível, poderíamos expressar também essa proteína nas células de inseto, podendo produzir uma vacina recombinante de subunidades contra duas doenças e não só contra o parvovirus suíno. A outra vantagem é que não houve purificação da VLP a partir do sobrenadante das células infectadas. Isso significa que a concentração de VLP por dose estava baixa por causa da presença dos outros componentes do meio. Com a purificação dessa proteína poderíamos alocar um número bem maior de partículas por dose de vacina, podendo também estimular uma maior produção de anticorpos contra o parvovirus suíno.

Já as vacinas inativadas contendo os adjuvantes: emulsão óleo-água, microemulsão, microesferas de quitosana e implantes de quitosana apresentaram resultados estatisticamente semelhantes quando se tratava de estimular a produção de anticorpos anti-parvovirus suíno. Entretanto, a facilidade em se formular a microemulsão, sua estabilidade em relação às emulsões óleo-água, sua ótima seringabilidade em relação às microesferas de quitosana, além da ausência de reações no local de sua aplicação em relação ao hidróxido de alumínio, faz deste adjuvante a melhor escolha quando se formula uma vacina inativada. Além disso, esse

adjuvante pode solubilizar fármacos hidrofílicos e lipofílicos (GASCO, 1997), ser inoculado intramuscularmente (MACEDO, 2004) e promover a apresentação cruzada de antígenos via MHC de classe I devido a presença de seu emulsionante, o Tween, capaz de causar apoptose celular e consequente fagocitose destas células (YANG, 2004).

Deve-se salientar que as vacinas formuladas com as microesferas e implantes de quitosana não continham igual quantidade de partículas virais quando comparadas com as outras vacinas formuladas (tanto com adjuvantes comerciais, quanto com a microemulsão) já que as microesferas de quitosana só foram capazes de adsorver 10% das partículas virais em suspensão. Entretanto, não houve diferença estatística significativa entre a resposta de anticorpos induzida pela vacina inativada contendo as microesferas de quitosana em comparação com a resposta induzida pela vacina inativada contendo o hidróxido de alumínio, responsável pela estimulação dos mais altos títulos de anticorpos de todas as vacinas analisadas neste experimento. Com isso, se conseguirmos aumentar a capacidade de adsorção das micropartículas de quitosana, talvez pudéssemos aumentar ainda mais o título de anticorpos induzido por esta vacina.

Todas as vacinas produzidas neste experimento foram capazes de induzir uma resposta de anticorpos satisfatória e protetora contra o parvovirus suíno.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS:

Questões de biossegurança estão aliadas a limitações práticas ligadas ao pobre crescimento *in vitro* do parvovirus suíno, justificando o desenvolvimento de vacinas alternativas. VLP são ótimos candidatos a vacinas por causa da estimulação da

resposta imune sem a presença do genoma viral ou de produtos gênicos virais potencialmente tóxicos. Além disso, quando comparadas com vacinas inativadas, VLP não requerem propagação do vírus infeccioso, os níveis de produção são muito altos, a produção é relativamente barata e as VLP são geralmente estáveis em condições ambientais extremas.

O sistema de expressão utilizando o baculovirus como vetor tem sido usado extensivamente para a produção de proteínas de capsídeo e de VLP em candidatos a vacinas humanas e veterinárias. A alta imunogenicidade dos produtos expressos, a alta produtividade do sistema e a habilidade de conseguir uma rápida implementação na produção em larga escala faz deste um dos melhores sistemas para se trabalhar quando o foco é a obtenção de antígenos vacinais.

Embora não tenha sido alvo de nosso estudo, outros autores (SEDLICK et al, 1997; PAN et al, 2008) tem demonstrado que VLP também podem estimular forte resposta mediada por células quando ligado a outras proteínas antigênicas. PAN e colaboradores (2008) mostraram que VLP de parvovirus suíno, produzido em sistema adenovirus, quando inoculados em camundongos, foi capaz de aumentar significativamente tanto a resposta humoral quanto a resposta celular quando ligada a uma proteína do circovirus suíno tipo 2. Como não utilizamos o outro sítio de multiclonagem contido no plasmídeo de expressão pFastBac Dual® durante a produção de nossa vacina de subunidades, este sítio poderia ser utilizado futuramente para clonar o gene de uma proteína importante na imunidade de qualquer outra doença importante na suinocultura mundial, tendo como produto uma vacina de subunidades bivalente. Outra perspectiva seria a inoculação de nossa vacina de subunidades via intranasal, que é

importante porta de entrada do parvovírus suíno no organismo. SEDLICK e colaboradores (1999) demonstrou que estas partículas também são capazes de estimular forte resposta imune quando inoculadas via intranasal, sendo importante na estimulação de imunidade de mucosa, mesmo sem o uso de adjuvantes. Além disso, se o uso do adjuvante fosse requerido, a quitosana seria um ótimo candidato no uso intranasal ou mesmo oral, já que a sua propriedade de mucoadesão já foi bem estudada anteriormente por diversos pesquisadores (LEHR e colaboradores, 1992; SOGIAS e colaboradores, 2008; HE, DAVIS e ILLUM, 1998).

8. CONCLUSÕES

- Micropartículas de quitosana, Implantes de quitosana e Microemulsões podem ser utilizadas como adjuvante em vacinas contra o PVS, induzindo a produção de altos títulos de anticorpos.
- A microemulsão é um excelente adjuvante, não só por estimular altos títulos de anticorpos anti-parvovirus suíno, como também por suas características como fácil formulação, grande estabilidade, ótima seringabilidade e ausência de reações no local de sua aplicação.
- Vacinas de subunidades contendo PVS-VLP são capazes de induzir a produção de altos títulos de anticorpos anti-parvovirus suíno, mesmo sem a presença de adjuvante na composição da vacina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia Cellular e Molecular immunology*. 7.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2012. 545p.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. *Cellular and molecular immunology*. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000. 553 p.
- ALLEN, P.C. Laboratory Animal Care and Use. 1994. IN: MALIK, V.S.; LILLEHOJ, E.P. *Antibody techniques*. San Diego: Academic Press, 1994.
- ALLISON, A.C.; BYARS, N.E. Adjuvants. IN: MALIK, V.S.; LILLEHOJ, E.P. *Antibody techniques*. San Diego: Academic Press, 1994. Cap. 6, p. 141-150.
- AMAND, S.T.; BEARD, J.C.; HUMPHRIES, K. *et al.* Analysis of splice junctions and in vitro and in vivo translation potencial of the small, abundant B19 parvovirus RNAs. *Virology*, v. 183, p. 133-142, 1991.
- ANTONIS, A.; BRUSCHKE, C.; RUEDA, P.; *et al.* A novel recombinant vírus-like particle vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. *Vaccine*, v.24, p.5481-5490, 2006.
- ALPAR, H.O. ; GROVES, M.J. Vaccine: Ancient. IN: GROVES, M.J. *Pharmaceutical Biotechnology*. 2.Ed. New York: Taylor & Francis, 2006. p.307-332.
- AUCOUTURIER, J.; DUPUIS, L.; GANNE, V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*, v.19, p.2666-2672, 2001.

- BADARO, R.; LOBO, I.; MUNOS, A. Immunotherapy for drug-refractory mucosal leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, v.194, n.8, p.1151-1159, 2006.
- BERNS, K.I.; HAUSWIRTH, W.W. Adeno-associated virus DNA structure and replication. IN: BERNS, K.I. *The parvoviruses*. New York: Plenum Press, 1983, p.1-31.
- BERSANO, J.G.; BASTOS, G.M.; SOARES, R.M. *et al.* Isolamento e identificação do parvovirus suíno no Estado de São Paulo. IN: VII Reunião Anual do Instituto Biológico, São Paulo, 1995. *Anais...* São Paulo, 1995, v. 30, p.37.
- BERSANO, J.G.; SCHOTTEN, M.H.S.; KROEFF, S.S. *et al.* Dados preliminares sobre a ocorrência de anticorpos para o parvovirus suíno no estado de São Paulo. IN: VI Reunião Anual do Instituto Biológico, São Paulo, 1993, *Anais...* São Paulo, 1993, v.30, p.17.
- BERGERON, J.; MENEZES, J.; TIJSSEN, P. Genomic organization and mapping of transcription and translation products of the NADL-2 strain of porcine parvovirus. *Virology*, v.197, p.86-98, 1993.
- BOUTWELL, R.K.; COLBURN, N.H.; MUCKERMAN, C.C. In vivo reactions of β -propiolactone. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.163, p. 731-763, 2006.
- BOZZOLA, J.J. Conventional specimen preparation techniques for transmission electron microscopy of cultured cells. *Methods Mol Biol*, v.369, p.1-18, 2007.
- BRAILOVSKY, C. Research on the rat K vírus (Parvovirus ratti). A method of titration by plaques and its application to the multiplication cycle of the virus. *Annales de Institute Pasteur*, v.110, n.1, p.49-59, 1966.
- BRASIL. *Farmacopéia Brasileira*. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
- BROWN JR. T.T; Laboratory evaluation of selected disinfectants as virucidal agents against porcine parvovirus, pseudorabies vírus, and transmissible gastroenteritis vírus. *American Journal of Veterinary Research*, v.42, p.1033-1036, 1981.
- CARTWRIGHT, S.F.; LUCAS, M.; HUCK, R.A.; A small heamagglutinating porcine DNA virus. Isolation and properties. *Journal of Comparative Pathology*, v.79, p.371-377, 1969.
- CASAL, J.I. Parvovirus diagnostics and vaccine production in insect cells. *Cytotechnology*, v.20, p.261-270, 1996.
- CASAL, J.I. Use of parvovirus-like particles for vaccination and induction of multiple immune responses. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 29, n. 2, p. 141-150, 1999.
- CASTANHEIRA, L.G.; CASTRO, J.M.A.; MARTINS FILHO, O.A. *et al.* Lactobacillus delbrueckii as a potential skin adjuvant for induction of type 1 immune responses, *Frontiers of Bioscience*, v. 12, p.1300-1307, 2007.
- CHAPMAN, M.S.; ROSSMANN, M.G. Structure, sequence and function correlations among parvoviruses. *Virology*, v. 194, p. 491-508, 1993.
- CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*, v.22, n.4, p.313-345, 2001.

- CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples. *Biotechniques*, v.15, p.532-537, 1993.
- COX, J.X.; COULTER, A.R. Adjuvants- a classification and review of their modes of action. *Vaccine*, v.15, n.3, p.248-256, 1997.
- CUNHA, A.S.; GONTIJO, M.M. Emulsões múltiplas: potenciais adjuvantes no desenvolvimento de medicamentos, vacinas e cosméticos. *Pharmaceutical Technology Brasil*, v.5, n.5, p.62-65, 2000.
- CUNHA, A.S.; GROSSIORD, J.L.; SEILER, M. Multiple emulsions – pharmaceutical potentiality. In: GROSSIORD, J.L.; SEILER, M. (Eds.), *Multiple emulsions, structure, properties and applications*. Paris: Editions de Santé, 1998, 443p.
- CUNHA, A.S.; GROSSIORD, J.L.; SEILLER, M. The formulation and industrial applications of multiple emulsions: an area of fast development. IN: Karsa, D.R. (Ed). *New Products And Applications In Surfactant Technology*, Sherffield Academic Press, Manchester, England, Cap.9, p.205-225, 1998.
- DAEFFLER, L.; HORLEIN, R.; ROMMELAERE, J.; *et al.* Modulation of minute virus of mice cytotoxic activities through site-directed mutagenesis within the NS coding region. *Journal of Virology*, v. 77, p. 12466-12478, 2003.
- DULBECCO, R., VOGT, M. Some problems of animal virology as studied by the plaque technique. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 18, 273-279, 1953.
- FOX, C.B.; ANDERSON, R.C.; DUTELL, T.S.; *et al.* Monitoring the effects of component structure and source on formulation stability and adjuvant activity of oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.65, n.1, p.98-105, 2008.
- GUALANDI, G.L.; LOSIO, N.M.; MURATORI, G.; *et al.* The ability by different preparations of parvovirus to enhance humoral immunity in swine and guinea pigs. *Microbiologia*, v. 11, n. 4, p. 363-369, 1988
- GARDNER, I.A.; CARPENTER, T.E.; LEONTIDES, L.; *et al.* Financial evaluation of vaccination and testing alternatives for control of parvovirus-induced reproductive failure in swine. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 208, n. 6, p. 863-869, 1996.
- GASCO, M.R. Microemulsions in the pharmaceutical field: perspectives and applications: in: SOLANS, C.; KUNIEDA, H. *Industrial applications of microemulsions*, Marcel Dekker, New York, v.66, cap.5, p.97-122, 1997.
- GOTO, Y., BOGATZKI, I.y.; BERTHOLET, S. *et al.* Protective immunization against visceral leishmaniasis using Leishmania sterol 24-c-methyltransferase formulated in adjuvant. *Vaccine*. 2007.
- GOUVEA, A.M.G.; *Alterações reprodutivas e prevalência de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para o parvovírus suíno no estado de Minas Gerais*. 1982. 58p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- GOUVEA, A.M.G.; GOMEZ, M.C.; REIS, R. Alterações reprodutivas e prevalência de anticorpos inibidores de

- hemaglutinação para o parvovirus suíno no estado de Minas Gerais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.4, p.17-22, 1984.
- GRADIL, C.; MOLITOR, T.; HARDING, *et al.* Excretion of porcine parvovirus through the genital tract of boars. *American Journal of Veterinary Research*, v.51, n.3, p.359-362, 1990.
- GRANADOS, R.R.; LI, G.X.; DERKSEN, A.C.G. *et al.* A new insect-cell line from *Thichoplasia ni* (BTI- Tn-5B1-4) susceptible to *Thichoplasia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.64, n.3, p.260-266, 1994.
- GUPTA, R.K.; CHANG, A.C.; SIBER, G.R. Biodegradable polymer microspheres as vaccine adjuvants and delivery systems. IN: BROWN, F.; HAAHEIM, L.R. *Modulation of the immune response to vaccine antigens*. Norway: Karger. p.63-78. 1998
- HARKNESS, J.; WAGNER, J. *Biologia e clínica de coelhos e roedores*. 3.ed. São Paulo: Roca, 1993. 238p.
- HE, P.; DAVEIS, S.S.; ILLUM, L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres International Journal of Pharmaceutics, V.166, N.1 P. 75–88, 1998.
- HEATH, W.R.; CARBONE, F.R. Immunology: Dangerous liaisons. *Nature*, V.425, 460-461, 2003.
- HOHDATSU, T.; BABA, K.; IDE, S. *et al.* Detection of antibodies against porcine parvovirus in swine sera by enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Microbiology*, v.17, n.1, p.11-19, 1988.
- HORWITZ, M.S. Parvoviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, B.B.; KNIPE, D.N.; HOWLEY, P.M. (Org.). *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. P. 2197- 2229.
- HORZINEK, M.C.; SCHIJNS, V.E.C.J.; DENIS, M.; *et al.* General description of vaccines. In: POSTORET, P.P.; BLANCOU, J.; VANNIER, P.; VERCHUEREN, C. (Eds.). *Veterinary vaccinology*. Cap. 6, p.140-152, 1997.
- HU, D.E.; MOORE, A.M.; THONSEN, L.L.; *et al.* Uric acid promotes tumor immune rejection. *Cancer Research*, v.64, p.5059-5064, 2004.
- JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; *et al.* *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 878p.
- JERABEK, J.; DRABEK, J.; MANOUSKOVA, V.; *et al.* Evolution of seroconversion in various laboratory animal species for porcine parvovirus. *Acta veterinaria brno*, v.3, p.331-336, 1987.
- JOHNSON, R.H.; DONALDSON-WOOD, C.R.; ALLENDER, U. Observations on epidemiology of porcine parvovirus. *Australian veterinary journal*, v.52, p.80-84, 1976.
- JOO, H.S.; DONALDSON-WOOD, C.R.; JOHNSON, R.H. A microneutralization test the assay of porcine parvovirus antibody. *Archives of virology*, v.47, n.4 p.337-341, 1975.
- JOO, H.S.; DONALDSON-WOOD, C.R.; JOHNSON, R.H. A standardized haemmagglutination inhibition test for Porcine Parvovirus antibody. *Australian Veterinarian Journal*, v52, p.422-24, 1976.

- JOO, H.S.; DONALDSON-WOOD, C.R.; JOHNSON, R.H. Rapid diagnostic techniques for detection of porcine parvovirus infection in mummified fetuses. *Australian Veterinarian Journal*, v.52, p.51-52, 1976.
- JOO, H.S.; JOHNSON, R.H. Serological responses in pigs vaccinated with inactivated porcine parvovirus. *Australian Veterinarian Journal*, v.53, p.550-552, 1977.
- JOO, H.S.; MOLITOR, T.W.; LEMAN, A.D. Antibody responses of guinea pigs, rabbits and pigs to inactivated porcine parvovirus. *Veterinary Microbiology*, v.9, p.27-33, 1984.
- KOOL M, SOULLIÉ T, VAN NIMWEGEN M, *et al.* Alum adjuvant boosts adaptative immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *The journal of Experimental Medicine*, v.205, n.4 p.869-82. 2008.
- KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.A.; MEEHAN, B.; *et al* Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotiv swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Veterinary Pathology*, v.37, p.254-263, 2000.
- LAWRENCE, M.J.; REES, G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*, v.20, p.89-121, 2000.
- LEHR, C. M.; BOUWSTRA, J.A.; SCHACHT, E.H. *et al.* In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, v.78, n.1-3, p. 43-48, 1992.
- LOBATO, Z.I.P. *Avaliação da resposta sorológica de suínos imunizados contra o parvovirus suíno com uma vacina inativada experimental e pelo método de "feed back" (retroinfecção)*. 1990. 90p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- LÜ, J.; ZHAO, J.; FANG, L. *et al.* A slide latex agglutination test for the rapid detections of antibodies in serum against porcine parvovirus. *Journal of Veterinary Medicine B*, v.53, p. 59-61, 2006.
- LUCAS, M.H.; CARTWRIGHT, S.F.; WRATHALL, A.E. Genital infection of pigs with porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology*, v.84, p. 347-350, 1974.
- MACEDO, L. B. *Desenvolvimento de novas formulações de vacinas contra o vírus da Língua Azul*. 2004. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MARTINS, R.M.; ROEHE, P.M.; GUIMARAES, I.J.; *et al.* Sorologia de parvovirus suínos em granjas do estado de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. IN: I Congresso Nacional de veterinários Especialistas em Suínos, Curitiba, 1984. *Anais...Curitiba*, 1984, p.39.
- MARTINEZ, C.; DALSGAARD, K.; LOPEZ DE TURIZO, J.A.; *et al.* Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity. *Vaccine*, v. 10, n. 10, p. 684-690, 1992.
- MCADARAGH, J.P.; ANDERSON, G.A. Transmission of viruses through boar semen. IN: 18th Annual Meeting. American Association of Veterinarian Laboratory

- Diagnosticians. Portland, 1975.
Proceedings... Portland, 1975, p.69-76.
- MCCLURKIN, A.W, NORMAN, J.O.
Studies on transmissible gastroenteritis of swine. II. Selected characteristics of a cytopathogenic virus common to five isolates from transmissible gastroenteritis. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* v.30, p.190-198, 1966.
- MENGELING, W.L.; CUTLIP, R.C.
Reproductive disease experimentally induced by exposing pregnant gilts to porcine parvovirus. *American Journal of Veterinary Research*, v. 37, p.1393-1400, 1976.
- MENGELING, W.L.; LAGER, K.M.; VORWALD, A.C. The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance. *Animal Reproduction Science*. V. 60-61, p.199-210, 2000.
- MENGELING, W.L. Porcine Parvovirus. IN: STRAW, B.E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W.L. *et al.* (Eds.), *Diseases of Swine*, 8.ed. Iowa State University Press, Ames, IA, p.119-124. 1999.
- MENGELING, W.L. Porcine parvovirus: properties and prevalence of a strain isolated in the United States. *American Journal Veterinary Research*, v.33, p.2239-2248, 1972
- MENGELING, W.L.; PAUL, P.S. The relative importance of swine and contaminated premises as reservoirs of porcine parvovirus. *Journal of the American veterinary Medical Association*, v.188, p.1293-1295, 1986.
- MIRANDA, A.C.C. *Avaliação da sensibilidade das linhagens celulares ST, PK15 e SK6 ao Parvovírus Suíno.* Dissertação. Ciência Animal, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 1992.
- MOLITOR, T.W.; JOO, H.S.; THACKER, B.J. Potentiating effect of adjuvants on humoral immunity to porcine parvovirus vaccines in guinea pigs. *Veterinary Microbiology*, v. 10, n. 3, p. 209-218, 1985.
- MORAES, M.P.; COSTA, P.R.S. Parvoviridae. In: FLORES, E. (Org.), *Virologia Veterinária*. Santa Maria: UFSM. 2007. P.275-296.
- NUESCH, J.P. COTMORE, S.F.; TATTERSALL, P. Sequence motifs in the replicator protein of parvovirus MVM essencial for nicking and covalent attachment to the viral origin: identification of the linking tyrosine. *Virology*, v.209, p. 122-135, 1995.
- O'HAGAN, D. (Ed.). *Vaccine adjuvants: preparation methods and research protocols*. Totowa: Humana Press, 2000.
- OLIVEIRA, B.F. *Preparação de microesferas de quitosana por spray drying com diferentes tipos de reticulação para uso na vacinação gênica*. 2004. 107p. Dissertação (Mestrado em Engenharia química) Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2004.
- ORAVAINEN, J.; HAKALA, M.; RAUTIAINEN, E. *et al.* Parvovirus antibodies in vaccinated ilts in field conditions- results with HI and ELISA tests. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 41, n.1, p. 91-93, 2006.
- PAN, Q.; HE, K.; HUANG, K. Development of recombinant porcine parvovirus-like particles as an antigen carrier formed by the hybrid VP2 protein

- carrying immunoreactive epitope of porcine circovirus type 2. *Vaccine*, v.26, p.2119-2126, 2008
- PARADISO, P.R. Infectious process of the parvovirus H-1: correlation of protein content, particle density, and viral infectivity. *Journal of Virology*, v.39, p. 800-807, 1981
- PARKER, J.; HERNIMAN, K.A.; GIBBS, E.P. *et al.* An experimental inactivated vaccine against Bluetongue. *Veterinary Record*, v.96, p. 284-287, 1975.
- PAUL, P.S.; MENGELING, W.L.; BROWN JR, T.T. Effect of vaccinal and passive immunity on experimental infection of pigs with parvovirus. *American Journal Veterinary Research*, v. 41, n. 9, p. 1368-1371, 1980.
- PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B. *et al.* 1992. *Laboratory methods in histotechnology*. Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington. 279 p.
- RAYET, B.; LOPEZ-GUERRERO, J.A. ROMMELAERE, J.; *et al.* Induction of programmed cell death by parvovirus H-1 in U937 cells: connection with the tumor necrosis factor alpha signalling pathway. *Journal of Virology*, v.72, p. 8893-8903, 1998.
- RENAULT, S. A. *Desenvolvimento de vacinas inativadas contra a Rinotraqueíte Infecçiosa Bovina e a Diarréia Bovina a Vírus*. 2002. 53p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- RESENDE, F.C.B.; PASSOLD, J.; FERREIRA, S.I.A.C. *et al.* Adjuvantes de vacinas: possibilidades de uso em seres humanos ou animais, *Revista brasileira de alergia e imunopatologia*, v.27, n.3, p.116-124, 2004.
- RHODE III, S.L.; Defective interfering particles of parvovirus H-1. *Journal of virology*, v.27, n.2, p.347-356, 1978.
- RIVERA, E.; SJOLAND, L.; KARLSSON, K.A. A solid phase fluorescent immunoassay for the rapid detection of virus antigen or antibodies in fetuses infected with porcine parvovirus. *Archives of Virology*, v.88, n.1-2, p. 19-26, 1986.
- RHODE III, S.L.; Defective interfering particles of parvovirus H-1. *Journal of Virology*, v.27, n.2, p.347-356, 1978.
- ROEHE, P.M.; SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.E.S.N. Parvovirose. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (Eds.); *Doenças de suínos*. Cãnone editorial, Goiânia, p.286-293, 2007.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Imunology*. 4.ed. London: Mosby, 1996.
- RUEDA,P.; FOMINAYA, J.; LANGEVELD, J.P.; *et al.* Effect of different baculovirus inactivation procedures on integrity and immunogenicity of porcine-like particles. *Vaccine*, v.19, n.7-8, p.726-734, 2000.
- SHADE, R.O.; BLUNDELL, M.C.; COTMORE, S.R. *et al.* Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from serum of a child during aplastic crisis. *Journal of Virology*, v. 58, p. 921-936, 1986.
- SAKURAI, M; NISHIMORI, T.; USHIMI, C.U.; *et al.* Nucleotide sequence of capsid protein gene of porcine parvovirus. *Virus research*, v.13, p.79-86, 1989.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed, vol. 3. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- SEDLIK, C.; SARRASECA, J.; RUEDA, P. *et al.* Immunogenicity of poliovirus B and T cell epitopes presented by hybrid porcine parvovirus particles. *Journal of general virology*, v.76, p.2361-2368, 1995.
- SEDLIK, C.; SARON, M.F.; SARRASECA, J. *et al.* Recombinant parvovirus-like particles as na antigen carrier: a novel non-replicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cells. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, v. 94, p. 7503-7508, 1997.
- SEDLIK, C.; DRIDIA, A.; DERIAUD, E. *et al.* Intranasal delivery of recombinant parvovirus-like particles elicits cytotoxic T-cell and neutralizing antibody responses. *Journal of Virology*, v.73, n.4, p.2739-2744, 1999.
- SEDLIK, C.; DADAGLIO, G; SARON, M.F.; *et al.* In vivo induction of a high-avidity, high-frequency cytotoxic T-lymphocyte response is associated with antiviral protective immunity. *Journal of virology*, v.74, n.13, p.5769-5775, 2000.
- SOGIAS, I.A.; WILLIAMS, A.C.; KHUTORYANSKIY, V.V. Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules*, v. 9, n.7, p.1837-1842, 2008
- SENEL, S.; McCLURE, S.J. Potencial applications of chitosan in veterinary medicine. *Advance drug delivery reviews*, v.56, n.10, p.1467-1480, 2004.
- SHI, Y.; EVANS, J.E.; ROCK, K.L., Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*, V.425, P.516-521, 2003.
- SIEGL, G.; BATES, R.C.; BERNS, K.I. *et al.* Characteristic and taxonomy of parvoviridae. *Intervirolgy*, v. 23, p. 61-73, 1985.
- SILVA, H.R.C.; SANTOS, K.S.C.R.; FERREIRA, E.I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.
- TIZARD, I.R. *Imunologia veterinária- uma introdução*, 8ed. Rio de Janeiro: Elsevier editora ltda, 2009. 587p.
- TOO, H.L.; SEAMAN, J.T.; LITTLEJOHNS, I.R. Evaluation of a gel diffusion precipitin test for porcine parvovirus. *Australian Veterinary Journal*, v. 60, n. 6, p. 161-165, 1983.
- TSAO, J.; CHAPMAN, M.S.; AGBANDJE, M. *et al.* The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science*, v. 251, p. 1456-1464, 1991.
- VALLET, J.L; FREKING, B.A. Differences in placental structure during gestation associated with large and small pig fetuses. *Journal of Animal Science*, v.85, n.12, p.3267-3275, 2007.
- VAN LEENGOED, LA.; VOS, J.; GRUYSS, E. *et al.* Porcine parvovirus infection: reviews and diagnosis in a sow herd with reproductive failure. *Vet Q*, v. 5, n. 3, p. 131-141, 1983.

VAUGH, J.L.; GOOWIN, R.H.;
TOMPKINS, G.J. et al. The establishment
of two cell lines from insect Sporodoptera
frugiperda. *In vitro*, v.13, p.213-217, 1977.

VIANA, F.A.B. *Guia terapêutico
veterinário*, 2.ed. Belo Horizonte: CEM.
2007

VOGEL, F.R.; POWELL, M.F.; ALVING,
C.R. A compendium of vaccine adjuvants
and excipients *Pharm Biotechnol*, v.6,
p.141-228. 1995.

WESTENBRINK, F.; VELDHUIS, M.A.;
BRINKHOF, J.M.A. An enzyme-linked
immunosorbent assay for detection of
antibodies to porcine parvovirus. *Journal
Virological Methods*, v.23, p.169-178,
1989.

WILHELM, S.; ZEEUW, E.J.L.; SELBITZ,
H.J. *et al.* Tissue distribution of two field
isolates and two vaccine strains of porcine
parvovirus in foetal organs after
experimental infection of pregnant sows as
determined by real-time PCR. *Journal of
Veterinary Medicine B*, v.53, p.323-326,
2005.

YANG, Y.; WU, C.; MORROW, W.J.W.
Cell death induced by vaccine adjuvants
containing surfactants. *Vaccine*, v.22,
p.1524-1536, 2004.

XIE, Q.; CHAPMAN, M.S. Canine
parvovirus capsid structure, analyzed at 2.9
Å resolution. *Journal of Molecular
Biology*, v. 264, p. 497-520, 1996.

ZÁDORI, Z.; SZELEI, J.; TIJSEN, P. Sat:
a late NS protein of porcine parvovirus.
Journal of Virology, v. 79, n. 20, p. 13129-
13138, 2005.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 142/2011**, relativo ao projeto intitulado "*Desenvolvimento de novas formulações de vacinas utilizando o parvovírus suíno como modelo*", que tem como responsável(is) **Marcos Bryan Heinemann**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo *Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)*, tendo sido aprovado na reunião de **6/ 07 /2011**.

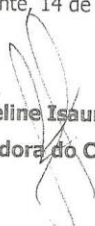
Este certificado expira-se em **6/ 07/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 142/2011**, related to the project entitled "*Development new formulation of vaccines using porcine parvovirus as a model*", under the supervisors of **Marcos Bryan Heinemann**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the *Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)*, and was approved in **July 6, 2011**.

This certificate expires in **July 6, 2016**.

Belo Horizonte, 14 de Julho de 2011.


Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br