



## DESENVOLVIMENTO DE VACINA POR ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA PARA PARVOVÍRUS SUÍNO E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM SUÍNOS

de Souza, A.R.<sup>1</sup>; Gava, D.<sup>3</sup>; Yamin, M.<sup>1</sup>; Ciacci Zanella, J.R.<sup>3\*</sup>; Gatti, M.S.V.<sup>1</sup>; Bonafe, C.S.F.<sup>1</sup>; de Lima Neto, D.F.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual; <sup>2</sup>Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, SP, Brasil; <sup>3</sup>Embrapa Suínos e Aves, Laboratório de Sanidade e Genética Animal, 89715-899, Concórdia, SC, Brasil

**PALAVRAS-CHAVE:** Parvovírus suíno, vacina, alta pressão hidrostática, mapeamento de epitopos, dinâmica molecular.

### INTRODUÇÃO

Parvovírus suíno (PPV), ou protoparvovírus unglado 1, são vírus DNA que apresentam as proteínas não estruturais NS1, NS2 e NS3, e as proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3, sendo estas últimas responsáveis por suas propriedades imunogênicas (1). Infecções por PPV causam falha reprodutiva em fêmeas não imunes, caracterizada por morte embrionária e fetal, levando à mumificação e natimortalidade (2). Duas principais cepas de PPV são descritas: NADL-2 (não-patogênica) e Kresse (patogênica), sendo que a análise de isolados recentes sugere evolução ativa desses vírus (2, 3). PPV é prevalente na população de suínos e altamente estável no ambiente, o que dificulta o estabelecimento e a manutenção de rebanhos livres desses vírus (2). Assim, é importante manter a imunidade dos animais a PPV, efetuando a vacinação regular das fêmeas reprodutoras.

As vacinas disponíveis comercialmente datam de 1980, sendo configuradas na cepa NADL-2 e quimicamente inativadas (2). Uma abordagem bem conhecida na produção de vacinas é o uso de preparações virais inativadas. Todavia, a alta pressão hidrostática (HHP) tem sido usada com sucesso para inativar vários vírus, preservando suas propriedades imunogênicas, e é considerada uma alternativa promissora no desenvolvimento de vacinas (4, 5). Além disso, a HHP é uma tecnologia livre de substâncias químicas, sendo segura e capaz de induzir fortes respostas imunes humorais e celulares (4, 5).

Neste estudo utilizamos uma combinação de abordagens *in silico* e *in vivo* para examinar as respostas imunes frente a diferentes formulações de HHP-PPV, e comparando os resultados com uma vacina comercial, quimicamente inativada.

### MATERIAL E MÉTODOS

O estudo experimental foi realizado com 10 suínos livres de patógenos específicos de 21 dias de idade, divididos em cinco grupos: (N)-(PPV nativo), (P)-(PPV submetido à HHP de 350 MPa a 25°C), (P-18)-(PPV submetido à HHP de 350 MPa a -18°C), (V)-(vacina comercial com PPV inativado) e (NC)-(controle negativo). Os suínos foram vacinados por via intramuscular no D0 (dia 0), D14, D28 e D38. No D51 todos os suínos foram desafiados por via intranasal com uma cepa de referência de PPV NADL-2. Amostras de soro foram coletadas em: D0, D14, D28, D38, D51, D58, D65 e D72 para pesquisa de anticorpos anti-PPV pelo teste de inibição de hemaglutinação (6). No D72 os suínos foram necropsiados e foram coletadas amostras de pulmão, coração, fígado, baço, rim e linfonodo para detecção de PPV por nested-PCR (7).

O estudo *in silico* foi compreendido de análises de *spot synthesis*, predição de epitopos lineares TCD4<sup>+</sup> e conformacionais TCD8<sup>+</sup>, e dinâmica molecular. Para o *spot synthesis*, foram sintetizados e preparados em membrana de celulose 180 peptídeos sobrepostos baseados na proteína VP1. Amostras de soro coletadas em D0, D28, D58 e D72 foram testadas, utilizando o *Totalab Quant-Array Analysis* para quantificar os *spots* conforme a intensidade da reação. Predições referentes à antigenicidade, hidrofobicidade, epitopos lineares e conformacionais foram realizadas nos servidores IEDB (8) utilizando as sequências de referência NADL-2 e a cristalografia 1K3V, correspondentes respectivamente às proteínas VP1 e VP2. Já a dinâmica molecular da estrutura cristalizada da proteína VP2 foi simulada utilizando o software GROMACS (v. 5.1.3) para avaliar o comportamento da estrutura em condições similares às impostas pela HHP (9).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

DNA de PPV foi detectado nos grupos (N) e (NC) no baço, fígado, linfonodo e pulmão. O grupo (V) resultou positivo apenas no linfonodo e rim. Ambos os grupos HHP (P e P-18) foram positivos no baço e no fígado, enquanto a positividade pulmonar foi identificada no grupo (P) e no linfonodo no grupo (P-18). DNA viral não foi detectado em amostras de coração de nenhum grupo. PPV apresentam tropismo por tecidos com alta taxa de replicação celular, sendo o tecido linfoide um deles (2, 10). O coração também tem sido demonstrado como um órgão com alta taxa de detecção de DNA de PPV, tanto em humanos quanto em animais, diferentemente do que foi observado neste estudo. Nenhum suíno apresentou anticorpos anti-PPV no início do experimento (D0). A partir do D14 os anticorpos anti-PPV começaram a ser detectados, porém com títulos baixos. Os suínos inoculados com HHP (grupos P e P-18) apresentaram títulos de anticorpos mais elevados que os suínos vacinados (V). Como esperado, após o desafio com PPV (D72), todos os animais soroconverteram, com títulos variando de 1024 a 2048.

O mapeamento de epitopos revelou diversos *spots* positivos de diferentes intensidades conforme o grupo. No total foram mapeados 20 sítios antigênicos correspondentes a 44 *spots* positivos, sendo que alguns já haviam sido previamente descritos (1, 11). O grupo controle (NC) mostrou-se positivo somente após o desafio viral (D72), ressaltando os sítios 13 e 16 (aa 493-512 e 585-608) como locais ativados pela infecção natural. O grupo (P-18) respondeu mais cedo que os outros grupos, conforme observado para os sítios 1, 3, 4, 6, 12, 18, 19 e 20. Além disto, foi o único grupo que ativou os sítios 5 (aa 101-116; 109-124), 7 (aa 209-224) e 11 (aa 429-444). Embora a HHP não afete diretamente a estrutura terciária das proteínas, a exposição de diferentes partes das proteínas, incluindo regiões hidrofóbicas, em resposta a essas condições, poderia explicar o surgimento de novos epitopos (12).

A avaliação *in silico* localizou epitopos lineares e descontínuos em células B que coincidiram com vários epitopos detectados por *spot synthesis*. Os epitopos localizados na proteína VP2 do PPV são importantes na indução de anticorpos neutralizantes, com alto potencial de ativar as células B (13). Estas abordagens *in silico* forneceram informações importantes sobre as interações antígeno/anticorpo necessárias para melhorar as respostas das células B ao PPV e podem ser usadas como estratégias para o desenho de novas vacinas.

## CONCLUSÕES

A combinação de HHP e mapeamento de epitopos nos forneceu uma perspectiva mais ampla e refinada do panorama de epitopos reconhecidos pelo PPV. Esta informação poderá potencialmente ser usada para rastrear rebanhos de suínos vacinados com vacina obtida via HHP como um primeiro cenário, ou, inversamente, ser empregada como uma alternativa combinada para cobrir a resposta imune contra PPV em condições de escape vacinal. Em conjunto, nossos achados ilustram detalhadamente a interpretação dada pelo sistema imunológico de suínos quando apresentados a PPV, alterado por pressão e temperatura, retratando a produção de anticorpos direcionada ao local ao longo do tempo, bem como uma dinâmica imunológica de seleção de anticorpos antes e depois dos desafios virais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Xie, H. *et al.* The epitope of the VP1 protein of porcine parvovirus. **Viol. J.** 7, 161, 2010.
2. Truyen, U. & Streck, A.F. Porcine Parvovirus. In: Zimmerman, J.J *et al.* (eds), **Diseases of Swine**, 2012, 5-17.
3. Streck, A.F. *et al.* Molecular epidemiology and evolution of porcine parvoviruses. **Infect. Genet. Evol.** 36, 300-306, 2015.
4. Silva, J.L. *et al.* Pressure-inactivated virus: A promising alternative for vaccine production. **Subcell. Biochem.** 72, 301-318, 2015.
5. Shearer, A.E.H., & Kniel, K.E. High hydrostatic pressure for development of vaccines. **J. Food Prot.** 72, 1500-1508, 2009.
6. Joo, H.S. *et al.* A standardised haemagglutination inhibition test for porcine parvovirus antibody. **Aust. Vet. J.** 52, 422-424, 1976.
7. Soucie, J.M. *et al.* Investigation of porcine parvovirus among persons with hemophilia receiving Hyate:C porcine factor VIII concentrate. **Transfusion** 40, 708-711, 2000.
8. Vita, R. *et al.* The immune epitope database (IEDB) 3.0. **Nucleic Acids Res.** 43, 405-412, 2015.
9. Grigera, J.R. & McCarthy, A.N. The Behavior of the Hydrophobic Effect under pressure and protein denaturation. **Biophys. J.** 98, 1626-1631, 2010.
10. Streck, A.F. *et al.* Analysis of porcine parvoviruses in tonsils and hearts from healthy pigs reveals high prevalence and genetic diversity in Germany. **Arch. Virol.** 158, 1173-1180, 2013.
11. Kamstrup, S. *et al.* Mapping the antigenic structure of porcine parvovirus at the level of peptides. **Virus Res.** 53, 163-173, 1998.
12. Lullien-Pellerin, V. & Balny, C. High-pressure as a tool to study some proteins' properties: conformational modification, activity and oligomeric dissociation. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.** 3, 209-221, 2002.
13. Martínez, C. *et al.* Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity. **Vaccine** 10, 684-690, 1992.