

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE UMA
VACINA INATIVADA DO VÍRUS DA BRONQUITE
INFECCIOSA AVIÁRIA ENCAPSULADO EM
NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA**

**Priscila Diniz Lopes
Médica Veterinária**

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE UMA
VACINA INATIVADA DO VÍRUS DA BRONQUITE
INFECCIOSA AVIÁRIA ENCAPSULADO EM
NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA**

Priscila Diniz Lopes

Orientador: Prof. Dr. Helio José Montassier

Coorientadora: Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

2017

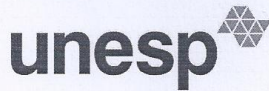
L864d Lopes, Priscila Diniz
Desenvolvimento e avaliação da eficácia de uma vacina inativada do vírus da bronquite infecciosa aviária encapsulado em nanopartículas de quitosana / Priscila Diniz Lopes. -- Jaboticabal, 2017
xii, 91 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientador: Helio José Montassier
Coorientadora: Renata Fonseca Vianna Lopez
Banca examinadora: Cintia Hiromi Okino, Rafael Antônio Cesarin Penha Filho, Edison Luiz Durigon, Rosângela Zacarias Machado
Bibliografia

1. Nanopartículas. 2. Resposta imune de mucosa. 3. Bronquite infecciosa das galinhas. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:615.371:636.6

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE UMA VACINA INATIVADA DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA AVIÁRIA ENCAPSULADO EM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

AUTORA: PRISCILA DINIZ LOPES

ORIENTADOR: HÉLIO JOSÉ MONTASSIER

COORDENADORA: RENATA FONSECA VIANNA LOPEZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: PATOLOGIA ANIMAL pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. CINTIA HIROMI OKINO
Pecuária Sudeste / EMBRAPA / São Carlos/SP

Pós-Doutorando RAFAEL ANTONIO CASARIN PENHA FILHO
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. EDISON LUIZ DURIGON
Departamento de Microbiologia / USP / São Paulo/SP

Profa. Dra. ROSANGELA ZACARIAS MACHADO
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 17 de novembro de 2017

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

PRISCILA DINIZ LOPES – nascida em 24 de março de 1986, na cidade de Machado, Minas Gerais. Médica Veterinária formada em dezembro de 2010, na Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina, em Andradina, São Paulo. Durante o curso de graduação, foi bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), na modalidade de Iniciação Científica, no período de abril de 2009 a março de 2010, sob orientação da Profa. Ms. Camila Motta Marin Bernardi, na área de nutrição animal, com o trabalho intitulado “Desempenho de leitões órfãos sob dois níveis de leite em pó na ração”. Nos meses de julho a novembro de 2010 realizou estágio de graduação na área de Bem estar animal e qualidade da carne – Suínocultura, no Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPISA), órgão da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), sob supervisão do Dr. Osmar A. Dalla Costa, auxiliando no projeto “Susceptibilidade ao estresse, desempenho, bem estar e qualidade da carne de suínos de diferentes linhagens genéticas, categorias de castração e níveis de ractopamina”. Em dezembro de 2013, defendeu a dissertação de mestrado “Avaliação da patogenia de estirpes de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Gallinarum biovar Gallinarum com os genes responsáveis pela expressão de flagelo ativos” pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração Patologia Animal, na FCAV – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior e coorientação do Prof. Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto. Foi bolsista FAPESP durante o mestrado. Em março de 2014 iniciou o curso de doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração Patologia Animal, na FCAV – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Hélio José Montassier e coorientação da Prof. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez. Entre Abril e Julho de 2015, realizou intercâmbio no Instituto de Biotecnología do Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) em Buenos Aires, Argentina, sob supervisão do Dr. Oscar Taboga com uma bolsa de estudo de Estadía Corta de Entrenamiento en Investigación del CONICET y La Organización de los Estados Americanos (OEA). Entre Abril e Outubro de 2017, realizou intercâmbio na Universidade de Auburn, Alabama, EUA, sob supervisão do Dr. Haroldo Toro e com uma bolsa de estudo da Capes (PDSE). Durante o doutorado foi bolsista CNPq.

“Nunca tenha certeza de nada. A sabedoria começa com a dúvida.”

Freud

Dedico...

... a vocês meus eternos amores, pai **Sebastião** e mãe **Meire**. Vocês estiveram sempre ao meu lado e eu estarei o resto da minha vida ao lado de vocês.

...a minha vó **Milta** (*in memoriam*), que sempre teve orgulho de falar da sua neta caçula, o quanto ela era “estudada”, meu eterno obrigado.

...aos **animais**, por me permitirem a pesquisa, me concedendo todos os conhecimentos. Que deram suas vidas para salvarem milhões de outras. A partir de agora, dedicarei toda a minha sabedoria a vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus. Ao lado Dele, finalizo esta caminhada. Ele me deu força e coragem, e me amparou por tantas vezes que quis desistir ou encontrei obstáculos.

Aos meus pais, Meire e Sebastião, obrigada pela dedicação, amor e carinho durante esses longos anos de estudo. Por apoiarem minhas loucuras e meus sonhos. Estarem ao meu lado e enfrentarem comigo todas as dificuldades.

Aos meus irmãos Douglas e Karina, e minha cunhada Kássia, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando para que eu finalizasse meus estudos.

Aos meus amigos Caren Pavani, Olívia Fabiano, Viviane Mariguela, Romeu dos Santos, Thayane Kasmanas, Daniele Araújo, Janine Denadai, Bruna Moura, Andrei Itajaí, Fátima Montassier e a todos os outros que conheci durante essa jornada. Cada momento com vocês foi essencial e especial em minha vida.

“O que seria da minha vida sem a Lurdinha?”, minha frase diária. A mulher que me ajudou, me acalmou, chamou minha atenção quando necessário, e alegrou meus dias. A Lurdes Tamanini, minha eterna gratidão.

Aos colegas do prédio da Microbiologia, Édna, Rosângela, Silvina, Assis, Prof. Fernando, Marita, entre outros, que sempre estiveram disponíveis para me ajudar, ouvir meus lamentos ou tomar um “cafezinho na copinha”.

Agradeço aos componentes da banca, Dr. Cintia Hiromi Okino, Dr. Rafael Penha Filho, prof. Dra. Rosangela Zacarias e o prof. Dr. Edson Durigon, pela disponibilidade, apoio e pelas sugestões para a melhoria da tese.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Suínos e Aves, a Universidade de São Paulo – USP Ribeirão Preto, e a empresa Seara em Nuporanga, pertencente ao grupo JBS, pelo apoio financeiro e científico. Agradeço também a prof. Dr. Eliana Gertrudes De Macedo Lemos por me permitir o acesso ao seu laboratório para processar as amostras.

A Dra. Cíntia Okino e ao Dr. Filipe Santos Fernando pelo apoio, parceria e ensinamentos.

A minha coorientadora, Prof. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez, da Universidade de São Paulo – USP Ribeirão Preto, que aceitou a parceria e o desafio deste projeto.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Helio José Montassier, que me acolheu e acreditou no meu potencial, e o principal, me deu liberdade para conduzir meu doutorado, da minha maneira, confiando em mim. Que me orientou com muita paciência e dedicação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que financiou minha pesquisa (Número do processo: 140100/2015-6).

E a todos que colaboraram de forma direta ou indiretamente para que eu finalizasse o meu doutorado.

Muito obrigada!!!

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Bronquite Infecciosa (BI) das galinhas	4
2.1.1 Características biológicas e estruturais do VBI	5
2.1.2 Patogenia do VBI	7
2.1.3 Resposta imune contra o VBI.....	9
2.2 Vacinas contra a BI.....	13
2.2.1 Vacinas vivas atenuadas contra o VBI	13
2.2.2 Vacina inativada contra o VBI	15
2.2.3 Novos modelos vacinais.....	16
2.3 Falhas vacinais – variantes e sorotipos	18
2.4 O uso de nanopartículas como adjuvante de vacina	20
2.4.1 Uso de quitosana para formulação de nanopartículas	23
2.5 Adjuvante oleoso Montanide.....	25
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos específicos	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Vírus	28
4.1.1 Propagação e isolamento viral	28
4.1.2 Titulação viral	28
4.1.3 Inativação viral	29
4.2 Otimização da preparação das nanopartículas.....	29
4.3 Preparação da vacina inativada do VBI encapsulado em nanopartículas de quitosana (VBI-CS).....	30
4.4 Características das nanopartículas VBI-CS.....	31

4.5 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	31
4.6 Preparação da vacina inativada incorporada ao adjuvante oleoso Montanide ISA 71	32
4.7 Delineamento experimental <i>in vivo</i>	32
4.7.1 Avaliação da ciliostase traqueal	34
4.7.2 Avaliação das lesões microscópicas	35
4.7.3 Extração de RNA.....	35
4.7.3.1 Quantificação da carga viral.....	36
4.7.3.2 Análise da expressão dos genes associados às respostas imunes cito-mediadas.....	36
4.7.4 Detecção de anticorpos anti-VBI sistêmicos (soro sanguíneo) e locais (secreção lacrimal)	39
5. ANÁLISE DOS RESULTADOS	40
6. RESULTADOS	41
6.1 Vírus	41
6.2 Otimização das nanopartículas.....	41
6.3 Características das nanopartículas VBI-CS.....	43
6.4 Citotoxicidade das nanopartículas	43
6.5 Avaliação da eficácia da vacina VBI-CS e comparação com a vacina inativada incorporada a um adjuvante convencional.....	43
6.5.1 Ciliostase.....	43
6.5.2 Avaliação das lesões microscópicas	45
6.5.3 Quantificação da carga viral.....	50
6.5.4 Avaliação das respostas imunes cito-mediadas.....	52
6.5.5 Mensuração de anticorpos na mucosa contra o VBI	56
6.5.6 Mensuração de anticorpos sistêmico contra o VBI.....	59
6.6 Correlação entre parâmetros das respostas imunes contra o VBI e as alterações patológicas induzidas por esse vírus.....	61
7. DISCUSSÃO	65
8. CONCLUSÕES	76
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 010140/14 do trabalho de pesquisa intitulado **“Desenvolvimento e avaliação da eficácia de uma vacina inativada do vírus da bronquite infecciosa aviária encapsulada em Nanopartículas de Quitosana revestidas com Alginato de Sódio”**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Hélio José Montassier está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 06 de junho de 2014.

Jaboticabal, 06 de junho de 2014.


Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE UMA VACINA INATIVADA DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA AVIÁRIA ENCAPSULADO EM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

RESUMO - Vacinação é a forma mais eficiente para prevenir e controlar a infecção pelo vírus da bronquite infecciosa (VBI). Vacinas formuladas com nanopartículas de quitosana têm sido utilizadas como sistema de entrega de antígenos pela via mucosa e imunopotenciador. O objetivo do presente estudo foi desenvolver e avaliar a eficácia de uma vacina inativada formulada com o genótipo BR-I do VBI encapsulado em nanopartículas de quitosana (VBI-CS) administrada por via mucosa em aves. Além disso, objetivou-se comparar a eficácia da vacina desenvolvida com a de uma vacina inativada convencional do mesmo vírus incorporada a um adjuvante oleoso (Montanide ISA 71) (VBI-O), administrada por via intramuscular. Foram avaliadas as respostas imunes humoral e celular (RIC) nos compartimentos de mucosa e sistêmico induzidas pelas vacinas VBI-CS e VBI-O quando associadas ou não a uma vacina viva atenuada da estirpe H120 do VBI. A proteção induzida pelos diferentes protocolos vacinais foi avaliada após o desafio com a estirpe homóloga virulenta do genótipo BR-I. A vacina VBI-CS usada sozinha induziu altos níveis de anticorpos IgA anti-VBI na mucosa e também a expressão dos genes de RIC (CD8 β , Granzima A e IFN γ) na traqueia, enquanto que associada a uma vacina viva atenuada heteróloga, induziu maiores níveis de anticorpos IgG anti-VBI (mucosa e sistêmico) e RIC caracterizada pelo aumento da expressão dos genes CD8 β , Granzima A e IFN γ , principalmente na traqueia. Além disso, foi observado que os protocolos vacinais utilizando a vacina VBI-CS induziram proteção nas aves contra o desafio com a estirpe homóloga do genótipo BR-I do VBI, conforme demonstraram as intensidades significativamente menores das alterações patológicas (ciliostase, histopatologia e carga viral) avaliadas na traqueia e nos rins, as quais ainda apresentaram correlações negativas significativas com as respostas imunes humoral e celular induzidas. Em relação aos resultados da vacina VBI-O, verificou-se que quando usada sozinha, esta vacina foi incapaz de induzir respostas imunes celular e humoral mais robustas nos compartimentos de mucosa e não protegeu de forma efetiva as aves contra o desafio, contudo quando utilizada conjuntamente com a vacina viva atenuada, induziu altos níveis de anticorpos IgG anti-VBI (nos compartimentos da mucosa e sistêmico), e a expressão aumentada dos genes de RIC (Granzima A e Perforina) na traqueia e rim, respectivamente, conferindo proteção efetiva contra o desafio. Conclui-se que a vacina VBI-CS administrada sozinha ou associada a uma vacina viva atenuada heteróloga induziu respostas imunes humoral e celular nos sítios primário e secundário sistêmico de replicação do VBI e foi efetiva em conferir proteção contra a desafio com essa estirpe variante do VBI.

Palavras-chave: carreador-adjuvante, resposta imune de mucosa, bronquite infecciosa das galinhas, nanopartículas, patógeno viral respiratório.

DEVELOPMENT AND EFFICACY EVALUATION OF AN INACTIVATED INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS VACCINE ENCAPSULATED IN CHITOSAN NANOPARTICLES

ABSTRACT - Vaccination is the most efficient way to prevent and control infection caused by the infectious bronchitis virus (IBV). Vaccines formulated with chitosan nanoparticles have been used as an antigen delivery system in mucosal and immunopotentiator. The aim of this study was to develop and evaluate the efficacy of an inactivated vaccine formulated with IBV BR-I genotype encapsulated in chitosan nanoparticles (IBV-CS) administered by the mucosal route in chickens. In addition, this study aimed to compare the efficacy of the developed vaccine with a conventional inactivated vaccine of the same virus incorporated into oily adjuvant (Montanide ISA 71) (IBV-O) administered intramuscularly. The humoral and cellular (CMI) mediated immune responses in the mucosal and systemic compartments induced by IBV-CS and IBV-O vaccines were evaluated, when these vaccines were associated or not with a live attenuated H120 serotype vaccine. The protection induced by the different vaccine protocols was evaluated after the challenge with the virulent homologous strain of BR-I genotype. The IBV-CS vaccine used alone induced high levels of IgA anti-IBV antibodies in mucosal and also the expression of CMI genes (CD8 β , Granzyme A and IFN γ genes) in the trachea, while associated with a live attenuated vaccine, it induced higher levels of IgG anti-IBV antibodies (mucosal and systemic compartments) and the expression of CMI genes, mainly in trachea. In addition, the vaccine protocols using the IBV-CS vaccine induced protection for chickens against challenge with the homologous IBV BR-I strain, as demonstrated by the significantly lower intensity of the pathological alterations (ciliostasis, histopathology and viral load) in the trachea and in the kidneys, which still had significant negative correlations with the antibody and cellular immune responses induced in the vaccinated chickens. The IBV-O vaccine was unable to induce alone a robust antibody and cellular immune responses in mucosal and did not confer effective protection to vaccinated chickens against the challenge with BR-I virulent strain. However, when IBV-O vaccine was used in conjunction with the live attenuated vaccine, it induced high levels of IgG anti-IBV at mucosal and systemic compartments and the expression of CMI genes such as Granzyme A and Perforin genes, in the trachea and in the kidney, respectively, providing effective protection against the challenge. IBV-CS vaccine administered alone or associated with a heterologous attenuated live vaccine induced humoral and cellular immune responses at the primary and secondary systemic sites of IBV replication and it proved to be effective against the challenge with a variant strain of IBV.

Keywords: delivery-adjuvant, mucosal immune response, avian infectious bronchitis, nanoparticles, respiratory viral pathogen.

LISTA DE ABREVIATURAS

aa: aminoácidos

APCs: células apresentadoras de antígeno

BI: Bronquite Infecciosa Aviária

DC's: células dendríticas

dpi: dias pós-infecção

DIE50: Dose infectante embrionária capaz de infectar 50% dos embriões

EE: eficiência do encapsulamento

FEG: fibroblastos de embriões de galinhas

h: hora

IFN: interferon

Ig: Imunoglobulina

IL: interleucina

LCA: líquido cório-alantoide

MALT: tecidos linfoides associados à mucosa

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

min: minuto (s)

PDI: Índice de Polidispersão

RIC: resposta imune celular

seg: segundo (s)

SPF: Livre de Patógenos Específicos

TPP: tripolifosfato de sódio

VBI: Vírus da Bronquite Infecciosa Aviária

VBI-CS: vacina inativada contendo uma variante brasileira nefropatogênica do VBI encapsulada em nanopartículas de quitosana

VBI-CS/ ON: vacina VBI-CS administrada por via óculo-nasal

VBI-O: vacina inativada contendo uma variante brasileira nefropatogênica do VBI incorporada ao adjuvante Montanide ISA 71

VBI-O/ IM: vacina VBI-O administrada por via intramuscular

VDN: vírus da doença de Newcastle

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Otimização das nanopartículas.....	30
Tabela 2. Delineamento experimental <i>in vivo</i>	34
Tabela 3. Sequências de primers usados no RT-qPCR para quantificação relativa. 38	
Tabela 4. Resultados da otimização das nanopartículas.....	42
Tabela 5. Número de aves apresentando diferentes escores de alterações microscópicas em traqueia, pulmão, rim e gônadas no 5 ^o e 11 ^o dpi.	47
Tabela 6. Correlação das respostas imunes humoral e celular com a ciliostase traqueal e com as cargas virais detectadas na traqueia e nos rins dos grupos vacinados com VBI-CS.	63
Tabela 7. Correlação das respostas imunes humoral e celular com a ciliostase traqueal e com as cargas virais detectadas na traqueia e nos rins dos grupos vacinados com VBI-O.....	64

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Partícula do VBI com as principais proteínas estruturais e o genoma de RNA. As proteínas S, M e E estão no envelope, enquanto a proteína N está ligada diretamente ao genoma viral.7
- Figura 2.** Diferentes formulações para otimização das nanopartículas. Legenda: (M) Marcador 100 bp; (CN) Controle Negativo; (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) Diferentes formulações de nanopartículas, conforme Tabela 1; (CP) Controle Positivo.42
- Figura 3.** As nanopartículas de quitosana encapsulando o VBI (VBI-CS) apresentaram forma esférica, conforme observadas na (A) Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e (B) Microscopia eletrônica de transmissão (MET).43
- Figura 4.** Médias de escores da ciliostase traqueal (representada pelos traços sozinhos ou dentro das caixas do gráfico, que representam a amplitude variação dos escores observados) das aves do grupo CN, CP, Nano, V+Nano, Óleo, V+Óleo. Letras diferentes representam diferenças significativas pelo Teste de Tukey entre os grupos de aves ($P \leq 0,05$). CN: aves do controle negativo; CP: aves do grupo controle positivo; Nano: aves vacinadas com VBI-CS; V+Nano: aves vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-CS; Óleo: aves vacinadas VBI-O; V+Óleo: aves vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-O.....45
- Figura 5.** Alterações microscópicas em diferentes órgãos de aves do controle negativo (CN), controle positivo (CP), vacinadas com VBI-CS (Nano), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-CS (V+Nano), vacinadas com VBI-O (Óleo), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-O (V+Óleo). A barra número 1 indica perda da camada ciliar, 2 infiltrado inflamatório com predominância de células mononucleares, 3 congestão na traqueia. A seta (\uparrow) indica infiltrado inflamatório com predominância de células mononucleares em rim, pulmão e gônada. O asterisco (*) indica hiperplasia de nódulos linfoides no pulmão.49

Figura 6. Média do Log10 do número de cópias de RNA do VBI detectados nas traqueias e rins das aves do controle negativo (CN), controle positivo (CP), vacinadas com VBI-CS (Nano), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-CS (V+Nano), vacinadas com VBI-O (Óleo), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-O (V+Óleo). As diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn's estão representadas por letras diferentes entre os grupos ($P \leq 0,05$).51

Figura 7. Média do Log10 do número de cópias de RNA do VBI detectados nos rins das aves do controle negativo (CN), controle positivo (CP), vacinadas VBI-CS (Nano), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-CS (V+Nano), vacinadas com VBI-O (Óleo), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-O (V+Óleo). As diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn's estão representadas por letras diferentes entre os grupos ($P \leq 0,05$).52

Figura 8. Expressão do gene da cadeia β do marcador CD8+ de linfócitos T citotóxicos (mensurado como média do número de vezes de alteração – “fold changes” em relação ao CN) nas amostras de traqueia e rim das aves do controle negativo (CN), controle positivo (CP), vacinadas com VBI-CS (Nano), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-CS (V+Nano), vacinadas com VBI-O (Óleo), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-O (V+Óleo). As diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn's estão representadas por letras diferentes entre os grupos ($P \leq 0,05$).53

Figura 9. Expressão do gene Granzima homóloga A (mensurado como média do número de vezes de alteração – “fold changes” em relação ao CN) nas amostras de traqueia e rim das aves do controle negativo (CN), controle positivo (CP), vacinadas com VBI-CS (Nano), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-CS (V+Nano), vacinadas com VBI-O (Óleo), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-O (V+Óleo). As diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn’s estão representadas por asteriscos ($P \leq 0,05$).54

Figura 10. Expressão do gene IFN γ (mensurado como média do número de vezes de alteração – “fold changes” em relação ao CN) nas amostras de traqueia e rim das aves do controle negativo (CN), controle positivo (CP), vacinadas com VBI-CS (Nano), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-CS (V+Nano), vacinadas com VBI-O (Óleo), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-O (V+Óleo). As diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn’s estão representadas por letras diferentes entre os grupos ($P \leq 0,05$).....55

Figura 11. Expressão do gene da Perforina-1 (mensurado como média do número de vezes de alteração – “fold changes” em relação ao CN) nas amostras de traqueia e rim das aves do controle negativo (CN), controle positivo (CP), vacinadas com VBI-CS (Nano), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-CS (V+Nano), vacinadas com VBI-O (Óleo), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-O (V+Óleo). As diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn’s estão representadas por letras diferentes entre os grupos ($P \leq 0,05$).....56

Figura 12. Média dos níveis de anticorpos anti-VBI do isótipo IgA (mensurado como valores médios A/P) na mucosa das aves dos grupos controles e vacinados no período que antecede o desafio e nos intervalos de 1, 5 e 11 dpi. As diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn's estão representadas com letras diferentes ($P \leq 0,05$). CN: aves do controle negativo; CP: aves do grupo controle positivo; Nano: aves vacinadas com VBI-CS; V+Nano: aves vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-CS; Óleo: aves vacinadas com VBI-O; V+Óleo: aves vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-O.....57

Figura 13. Média dos níveis de anticorpos anti-VBI do isótipo IgG (mensurado como valores médios A/P) na mucosa de aves dos grupos controles e vacinados no período que antecede o desafio e nos intervalos de 1, 5 e 11 dpi. As diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn's estão representadas com letras diferentes ($P \leq 0,05$). CN: aves do controle negativo; CP: aves do grupo controle positivo; Nano: aves vacinadas com VBI-CS; V+Nano: aves vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-CS; Óleo: aves vacinadas com VBI-O; V+Óleo: aves vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-O.....58

Figura 14. Média dos níveis de anticorpos anti-VBI do isótipo IgM (mensurado como valores médios A/P) no compartimento sistêmico das aves dos grupos controles e vacinados no período que antecede o desafio e nos intervalos de 1, 5 e 11 dpi. As diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn's estão representadas com letras diferentes ($P \leq 0,05$). CN: aves do controle negativo; CP: aves do grupo controle positivo; Nano: aves vacinadas com VBI-CS; V+Nano: aves vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-CS; Óleo: aves vacinadas com VBI-O; V+Óleo: aves vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-O.....59

Figura 15. Média dos níveis de anticorpos anti-VBI do isótipo IgG (mensurado como valores médios A/P) no compartimento sistêmico das aves dos grupos controles e vacinados no período que antecede o desafio e nos intervalos de 1, 5 e 11 dpi. As diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn's estão representadas com letras diferentes ($P \leq 0,05$). CN: aves do controle negativo; CP: aves do grupo controle positivo; Nano: aves vacinadas com VBI-CS; V+Nano: aves vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-CS; Óleo: aves vacinadas com uma vacina contendo adjuvante oleoso; V+Óleo: aves vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com a vacina contendo adjuvante oleoso.61

1. INTRODUÇÃO

A Bronquite infecciosa (BI) das galinhas é causada por um *Gammacoronavírus*, o vírus da bronquite infecciosa (VBI), e caracteriza-se por ser uma doença de distribuição mundial que provoca grandes prejuízos econômicos na avicultura industrial, uma vez que afeta o desempenho de aves de postura, de corte e também das matrizes. Ademais, trata-se de uma doença de caráter agudo, que acomete aves de qualquer idade e de ambos os sexos, sendo altamente contagiosa.

A BI é considerada uma das enfermidades de maior impacto socioeconômico para a indústria avícola brasileira. Considerando o Brasil o 2º maior produtor mundial e o 1º maior exportador de carne de frango, o controle e a prevenção desta doença são os métodos mais eficientes para diminuir o impacto da BI no plantel e manter a avicultura brasileira entre os cenários mais importantes no agronegócio.

A principal porta de entrada do VBI é o trato respiratório superior e anexos, como a conjuntiva ocular. Quando infectadas, as aves apresentam via de regra, sinais clínicos e lesões respiratórias. No entanto, alguns sorotipos e variantes do VBI apresentam tropismo e patogenicidade para outras células epiteliais, como as do rim e do trato reprodutor, causando outras formas da doença. Neste caso, quando os rins são afetados, uma forma mais grave dessa patologia será desencadeada.

Da mesma forma que ocorre em muitos países, como EUA, Argentina, Colômbia, Holanda, Egito, Canadá, no Brasil não tem sido diferente. Os surtos da BI têm sido frequentes e difíceis de controlar, devido ao grande número de variantes que constantemente emergem e são isolados. Os genótipos BR-I e BR-II têm sido isolados no Brasil, entretanto o genótipo BR-I é o que tem sido mais frequentemente isolado nas regiões de produção avícola mais intensa.

Ademais, devido à ampla distribuição do VBI, a prevenção e o controle da BI requer medidas rigorosas de biossegurança e procedimentos mais eficientes de imunoprofilaxia, os quais incluem principalmente programas de vacinações e preparações vacinais mais adequadas e efetivas a cada região ou país.

Vacinas inativadas são mais seguras para serem utilizadas na formulação de vacinas com estirpes de diferentes genótipos do VBI do que as vacinas vivas atenuadas, uma vez que contêm o vírus inativado e, portanto, são incapazes de

permitir a replicação viral no organismo hospedeiro. Além disso, as vacinas inativadas contra o VBI são geralmente formuladas com adjuvantes oleosos e são administradas por via intramuscular ou subcutânea. Apesar de sua maior segurança, as vacinas inativadas induzem mais respostas imunes sistêmicas, porém pouca ou nenhuma resposta imune local, tanto mediada por células, como por anticorpos e, conseqüentemente uma proteção de mucosa mais reduzida ou até mesmo respostas imunes sistêmicas de menor intensidade. Geralmente, essas vacinas são utilizadas como reforço após o uso de uma vacina viva atenuada, especialmente em aves de vida longa, para intensificar a resposta de proteção contra o VBI.

Devido a essas limitações quanto ao uso ou a performance das vacinas atualmente disponíveis contra o VBI, há uma constante busca por preparações vacinais alternativas na tentativa de se obter resultados melhores na imunoprevenção da BI. Nesse sentido, constata-se que o desenvolvimento de vacinas inativadas formuladas com adjuvantes de nova geração tem-se revelado promissor, pois algumas formulações revelam-se mais eficientes na indução de respostas imunes humoral e celular do que as formulações oleosas, principalmente junto à porta de entrada do patógeno. Em consonância com esses preceitos, as vacinas de nanopartículas de quitosana têm sido utilizadas para encapsular alguns antígenos de patógenos aviários importantes, como o vírus da doença de Newcastle e o vírus da Influenza, e têm se revelado capazes de induzir imune-proteção eficaz de mucosa e ser imunopotenciadores.

Ainda, foi verificado que a quitosana se caracteriza por ser um polímero catiônico natural e biodegradável que interage com moléculas carregadas negativamente, como as proteínas de partículas virais, assim como partículas aniônicas como o tripolifosfato de sódio (TPP), resultando em nanopartículas ou micropartículas. Dessa forma, passou-se a considerar que as partículas de quitosana acrescidas de antígenos passariam por vias mais efetivas de captura, processamento e apresentação de antígenos para as principais células imunocompetentes (linfócitos T e B) do que ocorre com as emulsões de adjuvantes oleosos mais antígenos, resultando na produção de mediadores humorais e celulares mais efetivos para conferir proteção contra os patógenos de mucosa, como o VBI.

Em vista do exposto anteriormente, foi realizado o presente estudo com o objetivo de desenvolver e avaliar a eficácia de uma vacina inativada formulada com uma estirpe do genótipo BR-I do VBI encapsulada em nanopartículas de quitosana para ser administrada por via óculo-nasal em aves SPF. Além disso, objetivou-se comparar a eficácia da vacina desenvolvida com uma vacina inativada convencional desse mesmo vírus incorporada a um adjuvante oleoso (Montanide ISA 71) e administrada por via intramuscular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bronquite Infecciosa (BI) das galinhas

A BI é causada pelo vírus da Bronquite Infecciosa (VBI) das galinhas, caracterizando-se por ser uma doença de distribuição mundial que acomete aves da espécie *Gallus gallus*. Atualmente é uma doença endêmica em países que tem uma intensa produção avícola (BANDE et al., 2016; JACKWOOD, 2012). A BI é uma doença transmissível de notificação obrigatória para a OIE (Organização Mundial de Saúde Animal), apresentando importância socioeconômica e implicações sanitárias, podendo trazer alguma repercussão impactante a qualquer momento no comércio internacional de produtos e animais (OIE, 2013).

A primeira descrição da doença foi em 1931, em Dakota do Norte, nos Estados Unidos (CAVANAGH, 2005). No Brasil, o VBI foi isolado pela primeira vez em 1957 e até hoje é um grande problema para a cadeia de produção avícola brasileira, em regiões onde a produção avícola encontra-se mais concentrada (CARRANZA et al., 2017; FRAGA et al., 2013).

Atualmente a BI é considerada a doença de maior impacto na avicultura industrial brasileira, com prevalência média de 70% nas regiões avícolas do país. O prejuízo econômico pode chegar a US\$ 4.221,5 para cada 1.000 aves (COLVERO et al., 2015).

Frangos de corte infectados com VBI apresentam desempenho zootécnico inferior, devido à baixa conversão alimentar e à redução no ganho de peso. Quando ocorrem infecções secundárias por bactérias, como *Escherichia coli*, o prejuízo é ainda maior, além da alta mortalidade, também pode ocorrer aumento na condenação de carcaças nos abatedouros. Já em poedeiras e matrizes, a doença pode afetar a produção de ovos. Aves adultas apresentam queda na produção e ovos de má qualidade. Aves jovens infectadas podem apresentar danos permanentes no oviduto e quando adultas, apresentam-se saudáveis, porém não produzem ovos, assim chamadas de “falsas poedeiras” (BANDE et al., 2016; CAVANAGH, 2007; COLVERO et al., 2015; JORDAN, 2017).

2.1.1 Características biológicas e estruturais do VBI

O VBI é um vírus de RNA de fita única e sentido positivo, pleomórfico, envelopado, arredondado, com diâmetro de cerca de 120 nanômetros (nm), que possui espículas constituídas por glicoproteínas em sua superfície de aproximadamente 20 nm, chamadas de proteínas S (CAVANAGH, 2007).

O VBI é classificado como um membro do grupo 3, da ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae* e gênero *Gammacoronavirus*. Nesse gênero estão os genótipos que causam infecções em espécies aviárias, como o Coronavirus da Bronquite Infecciosa (VBI), Coronavirus dos perus (TCoV), Coronavirus de faisões (PhCoV), Coronavirus de gansos (GCoV), Coronavirus de patos (DCoV), Coronavirus de pombos (PiCoV), e alguns outros coronavírus oriundos de mamíferos marinhos que estão sendo estudados (BANDE et al., 2016; CAVANAGH, 2005, 2007).

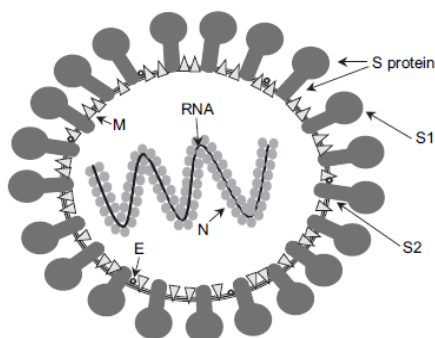
O VBI possui quatro proteínas estruturais; S, M, E e N (Figura 1). A proteína S (1160 aminoácidos - aa), como dito anteriormente, está presente na superfície e é subdividida em duas unidades, S1 (500 aa) e S2 (600 aa) (CAVANAGH, 2007). A S1 contém um domínio de ligação ao receptor celular (RBD) responsável pela ligação do vírus às células do hospedeiro, fundindo o envelope viral com a membrana celular e liberando o genoma viral para o interior da célula infectada. Além disso, possui epítomos vírus-neutralizantes, sendo, por conseguinte, a principal região indutora de anticorpos neutralizantes, definindo o sorotipo do VBI, e também está envolvida com o tropismo tecidual e na patogenicidade desse vírus (CARON, 2010; CAVANAGH, 2007; JORDAN, 2017). Ainda, a sub-unidade S1, possui os principais epítomos vírus-neutralizantes do VBI e foi verificado que essa região está sujeita à elevada ocorrência de mutações, resultando em diferentes estirpes virais que via de regra são classificadas em diferentes tipos antigênicos virais (sorotipos) (CAVANAGH, 2007; JORDAN, 2017). Já a sub-unidade S2 está envolvida com a fusão do envelope viral à membrana citoplasmática da célula alvo da infecção, o que contribui para a liberação do genoma viral no interior da célula infectada (CAVANAGH, 2003, 2007; JORDAN, 2017).

A proteína N (420 aa) compõe o nucleocapsídeo viral e estabelece associações diretas com o genoma do vírus. Esta proteína está envolvida na

replicação e montagem de novas partículas do VBI (IGNJATOVIĆ; SAPATS, 2000). Ademais, apresenta alta imunogenicidade e é capaz de induzir ambas as respostas imunes humoral e de linfócitos T citotóxicos (CAVANAGH, 2007; MONTASSIER, 2010). Uma particularidade interessante dessa nucleoproteína, é que ela apresenta uma certa variabilidade, tanto em tamanho quanto em composição, entre os diferentes grupos de Coronavirus. Por outro lado, ela apresenta maior grau de conservação dentro do mesmo grupo antigênico do gênero Coronavirus, quando comparada com outras proteínas estruturais e não estruturais (WILLIAMS et al., 1992).

As proteínas S e N são frequentemente analisadas para cada nova estirpe ou isolado do VBI, pois estão envolvidas com o surgimento de novas variantes e sorotipos desse vírus (ABREU et al., 2010; BANDE et al., 2016; CAVANAGH, 2007; MO et al., 2013; MONTASSIER, 2010). Apesar disso, deve-se salientar que já é fato muito conhecido, que o gene codificador e a glicoproteína da subunidade S1, demonstram ser as principais regiões envolvidas nas alterações de nucleotídeos e com consequentes alterações na composição de seus aminoácidos em algumas regiões mais propensas a esse fenômeno de variabilidade (regiões hipervariáveis) que ocorre com as estirpes do VBI. Essas variações podem acarretar mudanças relevantes de tropismo celular e antigenicidade, e às vezes, da patogenicidade das estirpes variantes do VBI que estiverem sendo geradas no curso da replicação viral (CAVANAGH, 2003; SJAAK DE WIT; COOK; VAN DER HEIJDEN, 2011).

A proteína M (230 aa) é a glicoproteína integral de membrana, responsável pela montagem do vírion e possui outras funções biológicas importantes, incluindo a estabilidade do nucleocapsídeo viral. Já, a proteína não glicosilada E (100 aa) é uma pequena proteína associada à membrana e está presente em pequenas quantidades nas partículas do VBI. Esta proteína está associada com a formação do envelope viral, montagem, brotamento, atividade do canal iônico e apoptose. Sabe-se também que as proteínas M e E são importantes para a replicação e formação de partículas virais (BANDE et al., 2016; CORSE; MACHAMER, 2003).



Fonte: Cavanaugh, 2005.

Figura 1. Partícula do VBI com as principais proteínas estruturais e o genoma de RNA. As proteínas S, M e E estão no envelope, enquanto a proteína N está ligada diretamente ao genoma viral.

2.1.2 Patogenia do VBI

A principal forma de transmissão do VBI é por via horizontal, através de aerossóis (espirros), materiais orgânicos contaminados e equipamentos. A transmissão vertical pode ocorrer, uma vez que já foi isolado o vírus de ovos de galinhas infectadas experimentalmente e de sêmem de galos (BANDE et al., 2016; IGNJATOVIĆ; SAPATS, 2000). Em geral, aves saudáveis se infectam através da inalação de partículas virais expelidas pelo trato respiratório de aves infectadas ou ainda, as partículas virais podem ser eliminadas nas fezes em fase aguda ou crônica da infecção (CAVANAGH, 2003, 2007; IGNJATOVIĆ; SAPATS, 2000).

O VBI invade as células do trato respiratório superior e anexos, como a conjuntiva ocular, e se replica nas células ciliadas e secretoras de muco nas primeiras 18-36 horas pós-infecção, atingindo altos títulos infectantes nas mucosas do trato respiratório superior entre dois a cinco dias pós-infecção (BANDE et al., 2016; CARON, 2010; CAVANAGH, 2007). Durante esse período, podem ser observados sinais clínicos como, espirros, estertores traqueo-bronqueolares, lacrimejamento e edema periocular com elevada morbidade e mortalidade em aves jovens, e queda de postura e/ou produção de ovos defeituosos (casca mole, rugosa e despigmentada) em poedeiras e reprodutoras. Além disso, as aves podem apresentar redução de peso e de apetite (CAVANAGH, 2003, 2007; IGNJATOVIĆ; SAPATS, 2000). Muitas vezes, infecções secundárias por *Escherichia coli* acentuam

o quadro clínico respiratório, resultando em alta mortalidade (BANDE et al., 2016; IGNJATOVIĆ; SAPATS, 2000).

As alterações anatomopatológicas observadas são perdas da camada de epitélio ciliar do trato respiratório superior, presença de exsudato seroso, catarral ou caseoso na traqueia e sinusite, além de pneumonia, inflamação causando opacidade de sacos aéreos, os quais podem ainda apresentar exsudato caseoso. Alterações microscópicas na traqueia como, deciliação, edema, descamação, hiperplasia e infiltração de células mononucleares na submucosa são geralmente observadas (BANDE et al., 2016; IGNJATOVIĆ; SAPATS, 2000).

Apesar de a infecção inicialmente ocorrer no trato respiratório, o VBI pode apresentar tropismo e patogenicidade por outras células epiteliais, como as dos rins e gônadas, e outros tipos celulares do trato gastro-intestinal (CAVANAGH, 2005, 2007; MONTASSIER, 2010). Em casos de estirpes nefropatogênicas, são observados rins aumentados de tamanho e com manchas esbranquiçadas, presença de túbulos distendidos e ureteres contendo cristais de urato, sendo que nesse caso, a mortalidade pode chegar a 25% das aves. Alterações citopáticas no epitélio tubular renal são observadas, como consequência, desenvolve-se inflamação intersticial e infiltrado de leucócitos polimorfonucleares na região medular e cortical do rim. Degradação tubular extensiva e necrose podem ser observadas entre 5 a 10 dias pós-infecção (BANDE et al., 2016; CONG et al., 2013; IGNJATOVIĆ; SAPATS, 2000).

No trato reprodutivo pode-se desenvolver, por ação da infecção por algumas estirpes do VBI, degeneração do ovário e ovidutos aumentados de tamanho nas fêmeas e infertilidade nos machos. Descamações de células epiteliais acompanhada da redução ou perda total dos cílios podem ser observadas no oviduto (BANDE et al., 2016; CHOUSALKAR; ROBERTS, 2007; IGNJATOVIĆ; SAPATS, 2000).

A persistência natural do VBI em diferentes órgãos do hospedeiro, ainda não está bem elucidada, porém, a detecção do vírus em tonsilas cecais e fezes por até 20 semanas pós-infecção, demonstra a possibilidade de uma transmissão e persistência viral, o que torna esse vírus ainda mais difícil de ser controlado (ALEXANDER; GOUGH, 1977; BANDE et al., 2016).

2.1.3 Resposta imune contra o VBI

As respostas imunes inata e adaptativa contra o VBI estão inter-relacionadas, sendo que a resposta inata e não específica é mais rapidamente ativada após a invasão viral e é considerada a primeira linha de defesa contra esse vírus (KAMEKA et al., 2014; OKINO et al., 2017).

Os padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) são componentes que constituem diversos microrganismos e que são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes em células do sistema imune inato e do epitélio (DOWNING et al., 2010; OKINO et al., 2017). Alguns deles estão presentes em aves, entre eles, os receptores transmembrânicos “Toll-Like” (TLRs), os receptores gene I induzido por ácido retinoico “RIGI-Like” (RLRs) e os receptores de domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos “NOD-like” (NLRs). O reconhecimento de PAMPs de microrganismos desencadeia uma série de ativações nas vias de transdução de sinais intra-celulares que culminam na ativação de diversos fatores de transcrição, como o fator nuclear κ B (NF- κ B) e fatores regulatórios de Interferon (IRF), os quais ativam a expressão de numerosos genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fatores do sistema complemento e interferons (IFNs) do tipo I (DOWNING et al., 2010; ZHANG et al., 2017).

Os TLR3, TLR7, MDA, LGP2 e NLRC5 são PRRs que, depois de interagirem com seus PAMPs específicos, dão início às respostas imunes inatas. No caso da infecção pelo VBI, tais respostas imunes inatas são então ativadas pela presença de PAMPs desse vírus, tais como os seus RNAs genômicos de cadeias simples e dupla (KAMEKA et al., 2014; OKINO et al., 2014; ZHANG et al., 2017). Assim, os PRRs depois de se combinarem com seus PAMPs ligantes específicos, levam, nas células infectadas, a ativação da expressão de genes que produzem IFN do tipo I α e β e citocinas pró-inflamatórias, os quais reduzem e/ou impedem a replicação e disseminação viral no organismo do hospedeiro, embora quando a expressão desses fatores não estiver bem regulada, poderão ser desencadeados mais danos às células e tecidos do organismo hospedeiro, o que é comumente observado com estirpes mais virulentas do VBI e em aves sem imunidade adaptativa contra esse vírus (OKINO et al., 2017; ZHANG et al., 2017).

A expressão de citocinas pró-inflamatórias está envolvida com o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares para o sítio primário da infecção viral. Entretanto, a produção de algumas citocinas varia dependendo da estirpe viral do VBI e da linhagem de aves infectadas (ASIF et al., 2007; FERNANDO et al., 2015; OTSUKI et al., 1987), sendo que a superprodução de algumas delas, como interleucina (IL) 6, IL1 β e IFN, podem resultar em graves lesões patológicas locais (FERNANDO et al., 2015; OKINO et al., 2014).

De uma forma geral, as citocinas são uma ponte para a resposta imune adaptativa, induzindo a quimiotaxia de células da imunidade adaptativa, ativando macrófagos e induzindo a diferenciação de células TH0 para células TH1 (XU et al., 2015).

A estrutura e diferenciação dos órgãos linfoides nas aves são bem diferentes dos mamíferos. As aves não possuem linfonodos e nem sistema linfático. Neste caso, outros órgãos e estruturas têm importantes papéis na resposta imune adaptativa contra o VBI. Sendo o timo e a bolsa de Fabricius considerados os órgãos linfoides primários, enquanto o baço, a glândula de Harder e agregados linfoides das pálpebras inferiores são os órgãos e tecidos linfoides secundários, bem como os tecidos linfoides associados às mucosas (MALT), tais como o CALT (associado à conjuntiva), o BALT (associado aos brônquios), o GALT (associado ao trato intestinal) e as tonsilas cecais (KAISER; BALIC, 2014; OLÁH; NAGY; VERVELDE, 2013).

A resposta imune adaptativa induzida pela infecção ou vacinação com o VBI pode ser dividida em resposta humoral e celular. Dessa forma, há dois órgãos linfoides importantes para a diferenciação de linfócitos: um responsável pela imunidade cito-mediada que equivale às células T maturadas no timo, e o outro pela produção de imunoglobulinas e anticorpos oriundos das células B produzidas na bolsa de Fabricius (OLÁH; NAGY; VERVELDE, 2013). Fatores que afetem o desenvolvimento desses órgãos podem resultar em um alto custo metabólico, interferindo no conjunto da resposta imune, afetando toda a vida da ave (CARON, 2010).

A apresentação dos principais epítopos de antígenos do VBI, incluindo àqueles situados na glicoproteína de espícula S1, pelas células apresentadoras de

antígeno (APCs) é o ponto inicial crítico para a geração das respostas imunes citomediada e humoral. Além disso, sabe-se que a presença de altos títulos de anticorpos está relacionada com a diminuição da carga viral (capacidade de replicação viral), assim como, com a melhora na produção e qualidade dos ovos, isso porque os anticorpos tem a função de neutralização viral (CARON, 2010; OKINO et al., 2013).

Os anticorpos do isótipo IgA são principalmente produzidos pelos linfócitos B presentes no MALT, enquanto que IgG e IgM são produzidos pelas células B também presentes no MALT ou podem ser produzidos sistemicamente, no baço por exemplo e então transportados até a mucosa. Todos esses isótipos de anticorpos podem atuar neutralizando as partículas do VBI (RAJ; JONES, 1997).

Ademais, a IgA é considerada o anticorpo primário da mucosa e está presente na mucosa traqueal, fluidos lacrimal e nasal, e oviduto. A glândula de Harder é a principal fonte de produção de anticorpos do isótipo IgA presentes na lágrima após a vacinação com uma vacina viva atenuada, administrada localmente (RAJ; JONES, 1997). Os anticorpos IgA têm um importante papel, uma vez que inibem a invasão do VBI na mucosa, que é o local primário de replicação desse vírus (CHHABRA et al., 2015; HOLMES, 1979; ZHAO et al., 2016). Altos níveis de IgA anti-VBI foram encontrados em fluidos lacrimais, nos quais apresentaram correlações com a resistência à reinfecção pelo VBI, assim como uma redução das alterações patológicas na traqueia e uma diminuição da carga viral (CHHABRA et al., 2015; OKINO et al., 2013; TORO; FERNANDES, 1994)

Os anticorpos anti-VBI do isótipo IgM estão presentes transitoriamente no soro logo após a infecção ou vacinação com o VBI. É a primeira imunoglobulina detectada e alcança um pico de concentração por volta de oito dias após a infecção ou a vacinação, por isso ela é útil para ser detectada em testes de soro-diagnóstico precoces ou na avaliação de um programa vacinal (DE WIT; SWART; FABRI, 2010).

Os anticorpos anti-VBI da classe IgG, também denominada como IgY, estão presentes tanto no soro quanto na mucosa. Essa classe de anticorpo aparece mais tardiamente, entre 10 e 14 dias pós-infecção ou vacinação, e permanece por um longo tempo. É o isótipo de anticorpos mais utilizado em técnicas sorológicas como ELISA, Vírus Neutralização (VN) e Inibição de Hemaglutinação (HI) para avaliar o

nível de resposta imune pós-vacinação ou para detecção de uma infecção (RAJ; JONES, 1997).

Os anticorpos IgG também podem ser transmitidos pela imunidade passiva, da galinha para o embrião, via gema, estando presente na mucosa e no soro do pintinho recém-nascido. Ademais, esses anticorpos são importantes nos primeiros dias de vida da ave, quando o sistema imune não está totalmente desenvolvido. A presença de anticorpos maternos na mucosa pode controlar a infecção pelo VBI nos primeiros dias de vida do pintinho, entretanto, pode interferir na indução de resposta imune pós-vacinação nesse período, e conseqüentemente, na eficácia da vacina que foi administrada (CARON, 2010; MONDAL; NAQI, 2001).

A resposta imune celular (RIC) é desencadeada pela proliferação e ativação das células T efectoras, sendo gerados os linfócitos T CD8+ com atividades citotóxicas (CTL) e as células T CD4+ auxiliares (TH) com capacidade de secretarem citocinas ativadoras de células T. Estas citocinas atuam principalmente para promover o aumento da proliferação de células B e diferenciação em plasmócitos produtores de anticorpos, além de estimularem a proliferação, maturação e atividade funcional das células T CD8+, desempenhando, assim, importantes papéis no controle da infecção pelo VBI (CHHABRA; CHANTREY; GANAPATHY, 2015; RAJ; JONES, 1997).

A resposta T CD8+ também é de crucial importância na fase inicial da infecção pelo VBI e está envolvida com a inibição da replicação viral e com a eliminação rápida e eficaz, tanto local quanto sistêmica, desse patógeno. As respostas mediadas por CTLs durante a infecção pelo VBI apresentaram correlações negativas com as alterações patológicas, como ciliostase, lesões microscópicas e carga viral, e também com a melhora clínica e patológica do animal. As funções efectoras do INF γ e do fator de necrose tumoral α também contribuem na eliminação viral junto com as células T CD8+ (CARON, 2010; CHHABRA; CHANTREY; GANAPATHY, 2015; CHHABRA et al., 2015; OKINO et al., 2013; 2014; PEI et al., 2001).

Sendo assim, a atividade das células T pode ser avaliada através dos níveis de INF γ , assim como a atividade das células T citotóxicas, avaliada pelos níveis de

expressão dos genes da Granzima A e da Perforina (ARIAANS et al., 2009; GURJAR et al., 2013; OKINO et al., 2013; 2014).

2.2 Vacinas contra a BI

Vacinação é uma forma estratégica para prevenir e controlar o VBI (BANDE et al., 2015; CAVANAGH, 2003; JACKWOOD, 2012; JORDAN, 2017). Os programas vacinais baseiam-se no uso de vacinas vivas atenuadas e inativadas. Vacinas vivas atenuadas são usadas, geralmente, no início da vida da ave, porém em toda a cadeia produtiva da indústria avícola, enquanto que as vacinas inativadas são usadas em aves de vida longa (poedeiras e matrizes) e na maioria das vezes, como reforço após a primo-vacinação feita com uma vacina contendo uma estirpe viva e atenuada do VBI (JACKWOOD, 2012; SJAAC DE WIT; COOK; VAN DER HEIJDEN, 2011; UMAR et al., 2016).

O sorotipo Massachussets (Mass) tem sido amplamente utilizado na formulação de vacinas durante anos e em vários países do mundo, desde que este foi o primeiro vírus a ser isolado (1930), e então, comercializado como vacina. Desde então, muitos países permitem apenas este sorotipo para a prevenção da BI. Entretanto, a dificuldade do sorotipo Mass produzir proteção completa contra diferentes sorotipos e variantes do VBI que estão emergindo, tem tornado o seu uso questionável (COOK; JACKWOOD; JONES, 2012; DE WIT; SWART; FABRI, 2010; JACKWOOD, 2012; SJAAC DE WIT; COOK; VAN DER HEIJDEN, 2011). A estratégia vacinal mais adequada e eficiente é idealmente utilizar genótipos e sorotipos específicos de cada região nas formulações vacinais para controlar os surtos recorrentes com as novas variantes (CHHABRA et al., 2015; COOK; JACKWOOD; JONES, 2012; JACKWOOD, 2012; JORDAN, 2017).

2.2.1 Vacinas vivas atenuadas contra o VBI

A primo-vacinação com uma vacina vida atenuada induz uma imunidade de curta duração, dessa forma, um reforço vacinal é realizado com o mesmo ou com outra combinação de sorotipo, duas ou três semanas mais tarde. Vacinas vivas atenuadas são administradas via mucosa, através da água de beber, por via óculo-

nasal ou por aerossol (spray), nas primeiras semanas de vida da ave (BANDE et al., 2015).

A estirpe do VBI, como vacina viva, é na maioria das vezes atenuada por sucessivas passagens em ovos embrionados livres de patógenos específicos (SPF) de aves, resultando na diminuição da patogenicidade, entretanto, pode ocorrer a diminuição da imunogenicidade. A redução da imunogenicidade pode provocar falhas na indução de resposta imune, o que resulta em uma falha na proteção induzida para a ave, quando esta entra em contato com estirpe virulenta do VBI (BRITTON et al., 2012; JORDAN, 2017; OIE, 2013).

Uma vacina viva atenuada eficiente é aquela em que o vírus vivo pode se replicar nas células teciduais do hospedeiro, sem causar a doença. Este tipo de vacina é eficiente para estimular a ativação de células B de memória e a transformação destas em células produtoras de anticorpos anti-VBI dos isótipos IgG, IgM e IgA, principalmente no compartimento das mucosas. Além disso, as vacinas vivas atenuadas contra o VBI promovem a ativação de células T de memória e efectoras no trato respiratório superior, especialmente os linfócitos T citotóxicos. Ambos os tipos de respostas imunes atuam no sentido de impedir a replicação do VBI, destruindo as partículas virais, reduzindo as alterações patológicas e melhorando o quadro patológico e clínico do hospedeiro (CARON, 2010; OIE, 2013; OKINO et al., 2013, 2014).

Apesar das diversas vantagens apresentadas por uma vacina viva atenuada, deve-se destacar também suas limitações. Por ser formulada com um vírus vivo atenuado, essa vacina pode apresentar reversão de virulência, lesões teciduais que podem resultar em infecções bacterianas secundárias, especialmente em plantéis de alta densidade, ou em aves que estejam sofrendo coinfeções com agentes imunossupressores. O vírus vacinal também pode também recombinar com as estirpes de campo, ou até mesmo sofrer mutações, o que contribui para o surgimento de novas variantes do VBI (BANDE et al., 2015; JACKWOOD, 2012; ZHANG et al., 2010a).

2.2.2 Vacina inativada contra o VBI

A primeira vacina inativada contra o VBI formulada com adjuvante oleoso foi desenvolvida na década de 60, a qual administrada sozinha não induzia completa proteção, uma vez que as aves vacinadas, quando submetidas ao desafio, não melhoravam a produção de ovos e nem apresentavam proteção contra a perda de atividade ciliar traqueal. Em outros experimentos, as aves imunizadas com uma vacina inativada produzida com uma maior quantidade de vírus apresentaram proteção parcial contra a infecção pelo VBI (CAVANAGH, 2003).

As vacinas inativadas contra o VBI quando administradas isoladamente induzem pouca imunidade sistêmica, mas quando essas vacinas são usadas após a vacina viva atenuada, este protocolo vacinal leva a produção de maiores títulos de anticorpos anti-VBI sistêmicos (BANDE et al., 2015; CAVANAGH, 2003). Deve-se ressaltar ainda, que vacinas inativadas contra o VBI induzem pouca ou nenhuma imunidade de mucosa, além de uma baixa atividade de linfócitos T citotóxicos (BANDE et al., 2015; CAVANAGH, 2003).

Assim como a maioria das vacinas inativadas de uso veterinário, a vacina inativada contra o VBI é formulada com adjuvante constituído por emulsão oleosa e administrada por via parenteral (intramuscular ou subcutânea) em aves de vida longa (IGNJATOVIĆ; SAPATS, 2000; OIE, 2013).

Embora, o uso de vacinas inativadas seja mais seguro, devido à ausência de reversão de virulência, indução de lesões patológicas pós-vacinação ou recombinação gênica com outras estirpes de campo, existem uma série de desvantagens. Entre elas, a necessidade de usar altas e/ou múltiplas doses de vacinas para induzir um nível eficiente de resposta sistêmica, além de ser necessário o uso de adjuvantes que auxiliem no reconhecimento do antígeno, o que encarece o custo vacinal. Ademais, vacinas inativadas são aplicadas por via parenteral, devendo ser administradas individualmente, necessitando de mão de obra para aplicação, conseqüentemente aumentando as despesas com a vacinação, além da possibilidade de lesões locais provenientes de reações adversas ou aplicações incorretas, resultando em rejeição ou redução do valor da carcaça (BANDE et al., 2015; IGNJATOVIĆ; SAPATS, 2000).

2.2.3 Novos modelos vacinais

A busca por novos modelos vacinais tem sido feita de forma intensiva nos últimos 20 anos, porém houve poucos avanços tecnológicos no desenvolvimento e na produção de vacinas contra o VBI, sendo que poucas dessas novas vacinas foram comercializadas. Existem ainda algumas limitações para o desenvolvimento e comercialização de novas preparações vacinais e, dentre elas, estão o custo e o método de aplicação (BANDE et al., 2015; JORDAN, 2017).

A indústria avícola opera com uma pequena margem de lucro, tornando significativo qualquer custo adicional por ave. Vacinas recombinantes possuem maior custo quando comparadas às vacinas tradicionais e, ainda assim alguns desses tipos de vacinas têm sido usados, devido à elevada eficácia e facilidade de aplicação. Outros novos modelos vacinais como vacina de DNA ou de subunidade, devem ser administrados individualmente, o que torna seu custo ainda mais elevado, comparado às vacinas vivas atenuadas, no qual há possibilidades de aplicação massiva (JORDAN, 2017).

Vacinas recombinantes usadas na indústria avícola, geralmente, são formuladas com Herpesvirus de perus (HVT) ou vetores virais, como fowlpoxvírus ou adenovírus. Algumas vacinas recombinantes expressando os genes S1 ou S2 do VBI foram desenvolvidas e apresentaram diferentes graus de proteção contra estirpes homólogas e heterólogas desse vírus (JOHNSON et al., 2003; TORO et al., 2014a, 2014b; ZHAO et al., 2017). Vacinas recombinantes contra o VBI formuladas com vetores virais aviários que apresentam tropismo para o trato respiratório, como os adenovírus, revelaram-se bons candidatos a novas preparações vacinais contra o VBI, uma vez que elas foram capazes de estimular uma forte resposta imune nos tecidos linfoides associados à cabeça das aves. Entretanto, deve-se destacar que nenhuma vacina recombinante para controle da BI foi comercializada até o momento (JORDAN, 2017).

Vacinas de peptídeos antigênicos, subunidades, ou de DNA contendo importantes genes codificadores de antígenos do VBI são eficientes na indução de resposta imune protetora contra a infecção. Vacinas de subunidades são formuladas com proteínas antigênicas do vírus, as de peptídeos com curtos segmentos de aminoácidos derivados de uma proteína antigênica e as vacinas de DNA

constituídas de plasmídeos que codificam proteínas antigênicas que são expressas dentro das células do hospedeiro (KAPCZYNSKI et al., 2003; TAN et al., 2016; TANG et al., 2008; YAN et al., 2013). No entanto, estas preparações vacinais ainda não foram comercializadas.

As respostas imunes geradas por vacinas de peptídeos, subunidades ou de DNA podem ser reforçadas pela adição de mediadores imunológicos, como citocinas ou adjuvantes, mas para que elas sejam realmente eficazes, devem ser administradas por via parenteral ou utilizar múltiplas doses, o que não é viável quando aplicadas em grande escala, como na avicultura industrial (BANDE et al., 2015; JORDAN, 2017).

Ainda, as vacinas contra o VBI geradas pelo método de genética reversa têm-se mostrado promissoras. Neste caso, o genoma do vírus alvo pode ser clonado e manipulado através da recombinação homóloga, PCR ou clonagem de outros genes de interesse diretamente no genoma viral de outro vírus (CASAIS et al., 2001; KEEP; BICKERTON; BRITTON, 2015, 2016). Armesto et al. (2011) desenvolveram através deste método, uma vacina na qual o gene S da espícula de uma estirpe apatogênica do VBI (Beau-R) foi substituída pela mesma proteína do mesmo sorotipo, porém patogênica (M41), resultando em um vírus apatogênico BeauR-M41(S), na qual induziu resposta protetora contra o desafio com a estirpe M41. A vantagem dessa metodologia é que se pode produzir uma vacina utilizando proteínas de uma estirpe variante recente com o tempo inferior quando comparado com o tempo necessário para propagação viral em ovos embrionados, técnica utilizada na produção de vacina viva atenuada (JORDAN, 2017).

Vacinas produzidas pelo método de genética reversa apresentam ainda muitas outras vantagens. Elas induzem um estado de proteção similar ao que é induzido por uma vacina viva atenuada tradicional, uma vez que o vírus recombinante permanece vivo e é capaz de infectar, replicar e induzir respostas imunes de proteção. Além disso, pode-se alterar a patogenicidade de um vírus de campo, obtendo-se um novo sorotipo vacinal após a manipulação do seu material genético pelo método de genética reversa, e assim administrar a nova vacina pela mesma via de administração de uma vacina viva atenuada tradicional, sem custo

adicional de aplicação, o que é interessante para a indústria avícola (BANDE et al., 2015; JORDAN, 2017).

Apesar de tantas vantagens, essa vacina apresenta um grande obstáculo, o licenciamento para ser utilizada. Vacina de genética reversa é considerada um novo vírus e pode demorar anos para ser licenciada, além disso, ela é um organismo geneticamente modificado (OGM), o que torna seu uso uma limitação para a sociedade que é contra a aplicação dessa prática, além do risco de recombinação com estirpes de campo do VBI e de sofrer mutações, que poderiam gerar novas variantes desse vírus (JORDAN, 2017).

2.3 Falhas vacinais – variantes e sorotipos

O VBI apresenta uma replicação rápida, alta taxa de mutação e uma facilidade de recombinação gênica que resulta em uma ampla variedade genética de estirpes. Muitos fatores podem estar envolvidos com o surgimento de novas variantes e sorotipos. Um deles é que o RNA polimerase RNA-dependente (RdRp) do vírus apresenta baixa fidelidade e habilidade limitada para corrigir erros quando ocorre a replicação viral, resultando em pontos de inserções de nucleotídeos, deleções ou mutações, principalmente no gene S1. Outro fator é que o uso de vacinas vivas atenuadas ou a presença de múltiplas infecções com diferentes sorotipos do VBI contribui para o processo de recombinação gênica (BANDE et al., 2015; JACKWOOD, 2012; MONTASSIER, 2010).

Uma pequena alteração na composição dos aminoácidos da proteína S1, isto é, por volta de 5%, especialmente se essas alterações atingirem epítomos vírus-neutralizantes, pode resultar na impossibilidade dessa estirpe mutante apresentar imunidade cruzada no hospedeiro contra estirpes que anteriormente apresentavam alto grau de similaridade de nucleotídeos do gene codificador da proteína S1 (BANDE et al., 2015; CAVANAGH, 2003). Sendo assim, é importante levar em consideração estirpes vacinais prevalentes para controle estratégico do VBI em cada região (IGNJATOVIC; GALLI, 1994; JACKWOOD, 2012).

Os surtos de infecção pelo VBI têm sido um grave problema em muitos países, causando grandes perdas econômicas para a indústria avícola. A maioria dos surtos estão relacionados com a presença de sorotipos e variantes que

emergiram ao longo dos anos. Países como EUA (MOORE et al., 1998), Argentina (RIMONDI et al., 2009), Cuba (ACEVEDO et al., 2012), Colômbia (CIFUENTES-RINCÓN; LOPES; SANMIGUEL P, 2016), Israel (MEIR et al., 2004), Itália (DOLZ et al., 2006), Índia (BAYRY et al., 2005), China (MO et al., 2012), Tailândia (POHUANG et al., 2009), Canadá (GRGIÆ, et al., 2008), Tunísia (BOUROGÂA et al., 2009), incluindo o Brasil (CHACÓN et al., 2011; MONTASSIER et al., 2008; FRAGA et al., 2013; VILLARREAL et al., 2010) já isolaram variantes do VBI.

No Brasil, o grupo Mass era o único licenciado pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) para a formulação de vacinas até 2015 (BALESTRIN et al., 2014). Os genótipos BR-I e BR-II do VBI que circulam no país apresentam baixa identidade com a região S1 das estirpes do grupo Mass (CHACÓN et al., 2011; FRAGA et al., 2013; VILLARREAL et al., 2010). Alguns desses genótipos apresentam tropismo para o trato respiratório, outros para o trato gastrointestinal, reprodutivo e/ou urogenital (BALESTRIN et al., 2014; CHACÓN et al., 2014; VILLARREAL et al., 2010).

Devido à baixa proteção cruzada entre as vacinas do tipo Mass e os genótipos brasileiros, em 2016 foi disponibilizada comercialmente uma vacina viva atenuada do genótipo BR-I, com o objetivo de aumentar proteção contra as variantes brasileiras (CHACÓN et al., 2016). Chacón et al. (2016) testaram a proteção da vacina viva atenuada BR-I contra diferentes variantes pertencentes ao grupo BR-I e compararam a proteção induzida pela vacina viva atenuada Mass. Esses autores observaram que a vacina contendo o genótipo brasileiro induziu total proteção contra o desafio com as estirpes homólogas, de acordo com os resultados dos sinais clínicos, da ciliostase traqueal e da carga viral, enquanto a vacina Mass falhou na indução de proteção cruzada completa contra estirpes do genótipo BR-I do VBI.

Outros países também optaram por desenvolver vacinas com genótipos regionais e estas vacinas têm apresentado proteção contra as variantes circulantes de cada região (BANDE et al., 2015; JACKWOOD, 2012). Nos EUA, as estirpes dos genótipos Arkansas (Ark), Connecticut (Conn), Delaware (Del), Georgia 08 (GA08) e GA98 foram, depois de atenuadas, autorizadas para entrarem na composição de vacinas a serem comercializadas. Além disso, na Europa, a estirpe vacinal 4/91 tem sido utilizada há um longo tempo (JACKWOOD, 2012; JORDAN, 2017).

Nesse contexto, tem sido observado que a vacina viva atenuada contendo a estirpe do genótipo GA98 comercializada nos EUA revelou sua capacidade em induzir proteção imune eficaz contra as estirpes homólogas e também contra algumas estirpes heterólogas do VBI, como a Delaware. Além disso, a vacina viva atenuada autógena GA08 foi disponibilizada porque estirpes deste genótipo estavam se espalhando rapidamente pelo estado da Geórgia e também pela região sudeste dos EUA, e nenhuma estirpe vacinal existente conferia proteção cruzada contra tais estirpes. Já o protocolo vacinal usado na Holanda, combinando as estirpes vacinais Ma5 (Mass) no 1º dia de vida e 4/91 no 14º dia, tem apresentado uma excelente proteção contra o desafio com o isolado holandês D388 no 28º dia de vida e também contra outras estirpes variantes heterólogas do VBI (JACKWOOD, 2012).

A estratégia vacinal de identificar os genótipos de cada região e selecioná-las como estirpe vacinal tem sido uma recomendação da OIE, assim como de muitos autores com experiência na área de vacinação e controle do VBI (BANDE et al., 2015; JACKWOOD, 2012; MONTASSIER, 2010; OIE, 2013; SJAAK DE WIT; COOK; VAN DER HEIJDEN, 2011). Entretanto, deve-se destacar que o uso de vacinas vivas atenuadas para cada região pode resultar também em consequências, como recombinação gênica ou o uso constante podem levar a indução de mutação viral devido a um processo evolutivo do VBI (MONTASSIER, 2010).

2.4 O uso de nanopartículas como adjuvante de vacina

Os adjuvantes são componentes químicos, microbianos ou derivados orgânicos utilizados para aumentar e/ou modular a resposta imune de um antígeno vacinal, que sozinho é incapaz de induzir uma resposta imune eficiente (SPICKLER; ROTH, 2003). Geralmente, as preparações antigênicas são constituídas por vírus inativados, vacinas recombinantes, de DNA ou de subunidades antigênicas (AUCOUTURIER; DUPUIS; GANNE, 2001; HEEGAARD; FANG; JUNGENSEN, 2016; SINGH; O'HAGAN, 2003). A escolha de um adjuvante irá depender do antígeno, da via de administração, da espécie alvo, e de qual o tipo de resposta imune que se deseja estimular, assim como o local de indução de respostas imunes e a duração da imunidade (AUCOUTURIER; DUPUIS; GANNE, 2001; SINGH; O'HAGAN, 2003).

Os adjuvantes podem ser divididos em duas classes, com base nos seus mecanismos de ação, podendo então ser classificados em imunopotenciadores ou em sistema de liberação de antígenos. Geralmente os PAMPs são os componentes dos adjuvantes imunopotenciadores, que agem ativando os elementos moleculares e celulares do sistema imune inato. Os adjuvantes como sistema de liberação de antígenos são particulados (emulsão, micropartículas, nanopartículas, complexos imunoestimuladores, lipossomos) e funcionam como um carreador de antígeno para as APCs. Alguns componentes desse tipo de adjuvante podem apresentar também efeitos imunoestimulatórios no hospedeiro (O'HAGAN; SINGH, 2003; SINGH; O'HAGAN, 2003).

De um modo geral, os adjuvantes devem ser estáveis, ter vida útil longa, biodegradáveis, de custo reduzido e capazes de promover respostas imunes mais efetivas, conferindo proteção contra um determinado patógeno (PETROVSKY; AGUILAR, 2004). Uma das preocupações ao se escolher um adjuvante é a sua toxicidade para os animais, pois muitos dos adjuvantes existentes ou suas formulações, embora potencializem fortemente a resposta imune de proteção, apresentam elevada toxidez quando utilizados de forma frequente (SINGH; O'HAGAN, 2003).

Os adjuvantes do tipo Freund, constituídos por emulsões oleosas minerais, e o hidróxido de alumínio têm sido utilizados há mais de 50 anos em vacinas inativadas de uso veterinário. Em geral, as vacinas contra o VBI são compostas por emulsões oleosas minerais. O uso desse composto pode apresentar certo grau de toxicidade ou causar reações inflamatórias no local da aplicação, já que são utilizados em preparações vacinais por via parenteral (AUCOUTURIER; DUPUIS; GANNE, 2001). Como consequência, há uma necessidade de desenvolver vacinas inativadas com adjuvantes de nova geração, buscando melhorar a aplicabilidade das vacinações, promovendo eficiência máxima com menor número de doses, liberação segura do antígeno, fácil administração, além de conferir imunogenicidade nos compartimentos da mucosa e sistêmico, e também segurança na proteção em aplicações massivas (AUCOUTURIER; DUPUIS; GANNE, 2001; GREGORY; TITBALL; WILLIAMSON, 2013; LEROUX-ROELS, 2010). As nanopartículas como sistema de liberação de antígenos apresentam estas, entre outras potenciais

vantagens quando utilizadas em vacinas para aves (EL NAGGAR; MADKOUR; HUSSEIN, 2017; VOLKOVA et al., 2014; ZHANG et al., 2010b; ZHAO et al., 2012, 2016).

O uso de nanopartículas na formulação de vacinas permite não só uma melhora na estabilidade e imunogenicidade do antígeno, como também, uma entrega lenta e direcionada do antígeno. Além disso, dependendo dos compostos presentes na formulação vacinal, pode haver um aumento da exposição do antígeno para o sistema imune, induzindo uma resposta imune mais eficaz. As nanopartículas têm sido exploradas como adjuvantes de administração não tradicional, como a via mucosa (GREGORY; TITBALL; WILLIAMSON, 2013; ZHAO et al., 2014b).

O grande interesse em vacinas de nanopartículas administradas por via mucosa decorre do fato de que esta superfície representa a principal via de invasão da maioria dos patógenos, assim como o VBI, que inicialmente invade o organismo hospedeiro através das mucosas do sistema respiratório superior. Assim, o epitélio nasal apresenta alta permeabilidade, baixa atividade enzimática e possui uma alta quantidade de células imunocompetentes. Além disso, o uso de uma vacina por via mucosa pode ser uma opção viável para a indústria avícola, uma vez que tem custo de mão de obra reduzido e facilidade de administração, já que não é necessária a utilização de seringas e agulhas (CSABA; GARCIA-FUENTES; ALONSO, 2009).

A presença de células imunocompetentes como células B, TCD4+, TCD8+, células dendríticas (DC's) e macrófagos, em órgãos e tecidos linfoides presentes nas mucosas da cabeça e especialmente no trato respiratório superior são importantes para o reconhecimento de antígenos vacinais, assim como a indução de respostas imunes celular e humoral, além da resposta imune de memória e da alta produção de anticorpos circulantes que irão proteger o animal em futuras exposições a patógenos específicos (CSABA; GARCIA-FUENTES; ALONSO, 2009).

As propriedades como tamanho, forma e características hidrofóbicas influenciam a interação das nanopartículas com as células do sistema imune e as proteínas plasmáticas (GREGORY; TITBALL; WILLIAMSON, 2013; ZHAO et al., 2014b). São consideradas nanopartículas quando apresentam tamanho menor que 1000 nanômetros (nm), sendo que as partículas menores que 500 nm são reconhecidas mais facilmente pelas DC's, enquanto partículas maiores que 500 nm

são mais facilmente reconhecidas por macrófagos (ZHAO et al., 2014b). Além disso, sabe-se que partículas entre 200 a 600 nm induzem altos níveis de IFN γ (GREGORY; TITBALL; WILLIAMSON, 2013).

Ademais, partículas esféricas são mais facilmente endocitadas pelas APC's (GREGORY; TITBALL; WILLIAMSON, 2013). Entretanto, em um estudo realizado por Niikura et al. (2013), foi observado que as partículas esféricas são mais eficientes na indução de uma resposta imune humoral quando comparadas com partículas cúbicas ou em forma de haste. Por outro lado, as partículas em forma de haste são mais eficientes no reconhecimento pelas APC's, sugerindo que a produção de anticorpos não é dependente da eficiência de reconhecimento das partículas esféricas pelas APC's.

E, para finalizar, já é fato reconhecido que partículas hidrofóbicas são mais eficientes na indução de respostas imunes do que partículas hidrofílicas (ZHAO et al., 2014b). Sendo assim, todas essas características podem ser modificadas durante a preparação das nanopartículas, com o objetivo de elas adquirirem características eficientes na indução de respostas imunes mais direcionadas contra um determinado patógeno.

2.4.1 Uso de quitosana para formulação de nanopartículas

Quitosana [α (1–4) 2-amino 2-deoxy β -D glucan] é um polissacarídeo catiônico natural constituído de glicosamina e N-acetilglicosamina, obtida de um polímero abundante na natureza chamado de quitina, que apresenta diversas variações de peso molecular e de grau de acetilação. A quitosana apresenta propriedades biocompatíveis, de biodegradabilidade, mucoadesiva, com capacidade de aumentar a permeabilidade epitelial, não tóxica e ainda, habilidade para ser facilmente modificada de diferentes formas e tamanhos desejados (AMIDI et al., 2010; ARCA; GÜNBEYAZ; ŞENEL, 2009; CHUA et al., 2012). Nanopartículas de quitosana têm sido amplamente utilizadas como vacinas de sistema de liberação de diversos antígenos, como vírus (ZHAO et al., 2012), DNA (ZHANG et al., 2010b), proteínas (SAWAENSAK et al., 2014), peptídeos (CHU et al., 2012), devido as suas propriedades biológicas favoráveis.

Nanopartículas de quitosana podem ser preparadas pelo método de gelificação ionotrópica, microemulsão, emulsificação-difusão de solventes e formação de complexos polieletrólíticos. Entre todas as metodologias existentes, a mais utilizada para preparação de vacina é a de gelificação ionotrópica, por ser simples, fácil, barata e não necessitar do uso de altas temperaturas e nem solventes orgânicos (AMIDI et al., 2010; ZHAO et al., 2012).

As nanopartículas obtidas através da gelificação ionotrópica resultam da interação dos grupos amina protonados da quitosana com alguns poliânions, como o tripolifosfato de sódio (TPP). Durante essa interação, o antígeno pode ser adicionado antes ou depois da adição do TPP, chamados de técnicas de incorporação e incubação, respectivamente (GAN; WANG, 2007), sendo que as cargas presentes no antígeno podem interagir tanto com a quitosana quanto o TPP.

Quitosana é insolúvel em água, necessitando ser dissolvida em uma solução ácida. Assim, sua solubilidade é pH dependente, sendo que a protonação da quitosana só ocorre em pH abaixo de 5,5. Quando em solução ácida, adquire alta carga residual positiva, permitindo interação com superfícies carregadas negativamente. Neste caso, há uma necessidade de trabalhar com antígenos estáveis em pH 5,5 ou inferior para obter melhores resultados na eficiência de encapsulamento, tamanho, PDI, potencial zeta e forma das nanopartículas (GAN et al., 2005; MATTU; LI; CIARDELLI, 2013).

Vacinas de nanopartículas de quitosana para serem administradas via mucosa têm sido amplamente utilizadas, devido a sua capacidade de induzir eficientes respostas imunes nesse compartimento. Quando as nanopartículas de quitosana são administradas via mucosa, a quitosana aumenta a adesão entre os antígenos vacinais e os tecidos da mucosa, e interage com o muco e as células epiteliais. Isto resulta na indução de uma redistribuição do citoesqueleto F-actina e das proteínas de junção ZO-1, e uma consequente abertura das junções celulares, aumentando a permeabilidade paracelular do epitélio e facilitando a entrada e entrega do antígeno para as APC's presentes no MALT (AMIDI et al., 2010; ILLUM et al., 2001). Após o processamento do antígeno pelas APC's, o antígeno é apresentado às células T presentes também no MALT, nas quais ativadas, estimulam as células B a produzir IgG e IgA locais (AMIDI et al., 2010).

Esta combinação de bioadesão e efeito no transporte paracelular têm levado os pesquisadores a considerarem a quitosana uma das melhores composições de adjuvantes como sistema de entrega de antígeno (ILLUM et al., 2001).

Em vários estudos, já foi observado que as nanopartículas de quitosana induziram altos níveis de anticorpos dos isótipos IgA e IgG na mucosa, além de provocar um aumento da ativação de macrófagos e de células polimorfonucleares, assim como os níveis de citocinas (IL-2, IL-10, IFN γ), melhorando a RIC local (KUMAR et al., 2002; VAN DER LUBBE et al., 2001; VOLKOVA et al., 2014, WEN et al., 2011). Em um outro estudo, foi observado que além do aumento dos títulos de anticorpos na mucosa, a quitosana induziu altos níveis de anticorpos sistêmicos após a administração nasal de uma vacina de nanopartículas contra Influenza em camundongos (BACON et al., 2000).

Partículas de quitosana já foram usadas também para encapsular diversos antígenos e componentes de alguns patógenos aviários, como vacinas de DNA contra o vírus da doença de Newcastle (VDN) (ZHAO et al., 2014a), vacina viva atenuada (ZHAO et al., 2012) e inativada do VDN (VOLKOVA et al., 2014). Todas as vacinas preparadas com quitosana revelaram-se eficientes na indução de resposta imune humoral, principalmente de mucosa, e conferiram proteção efetiva as aves contra o desafio com estirpes virulentas do VDN.

De uma forma geral, a quitosana apresenta ser um polímero eficiente tanto como adjuvante de sistema de entrega, protegendo o antígeno da degradação, quanto polímero imunopotenciador, auxiliando na indução de uma forte e direcionada resposta imune contra o patógeno.

2.5 Adjuvante oleoso Montanide

Montanide é uma classe de adjuvantes de natureza oleosa e mineral que inclui diferentes composições, como emulsão, microemulsão e adjuvantes poliméricos. Montanide é considerado um adjuvante de nova geração e tem sido extensivamente utilizado em vacinas veterinárias devido a sua eficiência de induzir forte resposta imune e conferir uma maior segurança durante o uso quando comparado com as emulsões de Freund água *in* óleo. Entretanto já foram

observadas reações inflamatórias locais após sua administração (GARÇON; LEROUX-ROELS; CHENG, 2011; PETROVSKY; AGUILAR, 2004).

Montanide age como adjuvante de depósito, liberando o antígeno de forma lenta e induzindo a produção de anticorpos (PETROVSKY; AGUILAR, 2004). Montanide ISA 71 é um óleo mineral refinado da classe Montanide, formulado para induzir RIC do tipo TH1 e melhorar a resposta humoral, produzindo maiores títulos de anticorpos, principalmente da classe IgG, mesmo utilizando um antígeno de baixa imunogenicidade (KLIMKA et al., 2015).

A preparação de Montanide ISA 71 tem sido utilizada como adjuvante em vacinas contra Coccidiose e Influenza aviária e tem induzido elevados níveis de anticorpos sistêmicos, conferindo proteção contra o desafio com o patógeno específico (DUPUIS et al., 2006; JANG et al., 2011, 2012, 2013; LONE; SPACKMAN; KAPCZYNSKI, 2017). Ainda, o adjuvante Montanide ISA 71 foi usado na formulação de uma vacina inativada do VBI administrada por via intramuscular. Essa vacina induziu imunidade celular e humoral adequada contra o desafio, sugerindo que essa classe de adjuvante apresenta ser uma melhor opção quando comparado com os adjuvantes tradicionais de uso injetável (SANTOS, 2014).

Três classes de Montanide foram utilizadas para melhorar uma vacina viva atenuada contra o VBI contendo a estirpe H120 atenuada e foram comparadas entre si. Montanide ISA 201 VG (emulsão óleo em água), Montanide Gel 01 ST (polímero) e Montanide™ IMS 1313 N VG (nanopartículas em uma fase aquosa) foram usados nas formulações de vacinas administradas por via intranasal ou por spray. As formulações contendo polímero e as nanopartículas utilizadas por via intranasal induziram maiores títulos de anticorpos quando comparadas com a formulação contendo emulsão, protegendo as aves contra o desafio (DEVILLE et al., 2012).

De uma forma geral, Montanide tem-se mostrado uma classe de adjuvantes oleosos eficientes na formulação de vacinas aviárias.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver e avaliar a eficácia de uma vacina inativada contendo uma variante brasileira nefropatogênica do VBI encapsulada em nanopartículas de quitosana (VBI-CS).

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Desenvolver uma nova preparação vacinal constituída por nanopartículas de quitosana e suspensão de estirpe do genótipo BR-I do VBI inativada, pelo método de gelificação ionotrópica e avaliar suas propriedades físico-químicas, morfológicas e estruturais;

3.2.2 Avaliar as respostas imunes humoral e celular induzidas nos compartimentos da mucosa e sistêmico pela vacina de nanopartículas de quitosana e a proteção conferida por essa vacina após o desafio com a estirpe homóloga virulenta do genótipo BR-I do VBI;

3.2.3 Comparar as respostas imunes induzidas e o grau de proteção conferidos pela vacina de nanopartículas administrada por via óculo-nasal (VBI-CS/ ON) com as respostas imunes e o grau de proteção induzida por uma vacina contendo a mesma estirpe do genótipo BR-I do VBI inativada e incorporada ao adjuvante oleoso Montanide ISA 71 (VBI-O) para ser administrada pela via intramuscular (VBI-O/ IM);

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Vírus

Foi utilizada uma estirpe variante brasileira nefropatogênica do VBI IBV/Brazil/PR05 (nº de acesso no NCBI: GQ169242), previamente genotipada por meio de sequenciamento de nucleotídeos do gene da glicoproteína S1 (MONTASSIER et al., 2008; 2012). A estirpe pertence ao banco de microrganismos do Laboratório de Imunologia e Virologia do Departamento de Patologia Veterinária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - campus de Jaboticabal (UNESP – FCAV).

4.1.1 Propagação e isolamento viral

A propagação da estirpe IBV/Brazil/PR05 foi realizada em ovos embrionados Livre de Patógenos Específicos (SPF) com 9 dias de incubação, de acordo com a metodologia descrita por Owen et al. (1991). Foram utilizados 30 ovos, sendo 25 destinados à propagação viral e cinco ao controle negativo da infecção. A inoculação foi feita na cavidade cório-alantoide, administrando-se um volume de 100 µL/ovo de suspensão viral diluída a 1:10 em Meio de cultura Eagle (Gibco Cell Culture, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) contendo antibióticos (200 UI/mL de Penicilina e 50 µg/mL de Estreptomicina) e antifúngico (50 UI/mL de Anfotericina B). Após 24 horas (h) de incubação, os ovos foram avaliados, sendo considerada inespecífica a mortalidade ocorrida neste período; e, 36 h pós-inoculação, os ovos remanescentes foram resfriados a 4°C e o líquido cório-alantoide (LCA) colhido e estocado a -70°C.

4.1.2 Titulação viral

A infectividade viral da estirpe foi determinada por inoculações de diluições seriadas de razão constante e igual a 10 do vírus (10^{-1} a 10^{-9}) obtido do LCA infectado com a estirpe IBV/Brazil/PR05 seguindo a metodologia descrita por Gelb Jr.; Wolff e Moran (1991). A amostra foi diluída em Meio Eagle (Gibco Cell Culture, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) contendo antibióticos (200 UI/mL de Penicilina e 50 µg/mL de Estreptomicina) e antifúngico (50 UI/mL de Anfotericina B).

As suspensões foram inoculadas na cavidade cório-alantoide, no volume de 100 µL/ovo, sendo utilizados cinco ovos para cada diluição, além de dez ovos destinados ao controle negativo (não infectados). A mortalidade foi observada durante todo o período de incubação, considerando-se morte inespecífica até 24 h pós-inoculação; ao final de sete dias, as alterações embrionárias dos sobreviventes foram analisadas.

4.1.3 Inativação viral

O LCA foi tratado com beta-propiolactona (BPL) na concentração 1:2000 e incubado a 37°C/ 90 minutos (min), sob agitação contínua do LCA tratado (McDOUGALL, 1969).

4.2 Otimização da preparação das nanopartículas

Foram utilizados quitosana de médio peso molecular (MW; peso molecular 190.000 – 310.000) de 75-85% de desacetilação e tripolifosfato de sódio (TPP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). A quitosana foi dissolvida em ácido acético 60,05 M (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e incubada a 24°C por 18 h sob agitação constante. Depois de completamente dissolvida, a quitosana foi filtrada (Filtro Whatman, 40 cm de diâmetro) para obter uma solução estoque de 0,2% (2 mg/mL).

Foram testados diferentes concentrações de ácido acético para dissolver a quitosana (1, 2 e 3%) e valores de pH de 4,5 e 5,5. Diferentes concentrações de quitosana (2 mg/ml, 1 mg/ml, and 0,5 mg/ml) e TPP (2 mg/ml, 1 mg/ml, and 0,5 mg/ml) (Tabela 1) também foram testadas. Todos os testes foram realizados em triplicatas. Os volumes da solução de quitosana (5 mL) e do LCA (600 µL) foram fixados, alterando apenas o volume do TPP (Tabela 1).

O tamanho das nanopartículas e o índice de polidispersão (PDI) (Tabela 1) foram medidos no aparelho analisador de tamanho de partícula ZetaSizer Nano ZS90 (Nano Series, Malvern Instrumentos Ltd, Worcestershire, UK). A eficiência do encapsulamento (EE) foi avaliada pela dosagem de proteína não encapsulada presente no sobrenadante através da técnica de Bradford e pela detecção do RNA genômico viral por meio da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) do vírus encapsulado (Tabela 1).

O RNA viral foi extraído com o kit comercial Trizol Reagent (Invitrogen, Life Technologies), seguindo as recomendações do fabricante. O RNA foi submetido à síntese de cDNA utilizando 5 µL de RNA viral, o kit da enzima SuperScript III (Thermo Fisher, Massachusetts, USA) e Random Primers (Thermo Fisher, Massachusetts, USA), conforme as recomendações do fabricante. A técnica de RT-PCR foi realizada seguindo a metodologia descrita por Wang e Huang (2000).

A formulação com os melhores resultados foi escolhida para o desenvolvimento da vacina de nanopartículas.

Tabela 1. Otimização das nanopartículas.

Formulação	Quitosana 5ml (%)	TPP (%)	Volume do TPP (ml)
1	0,2	0,2	1
2	0,2	0,1	1
3	0,1	0,1	1
4	0,1	0,1	2
5	0,05	0,05	2,5
6	0,05	0,1	1
7	0,05	0,1	2,5
8	0,05	0,1	1,5

TPP: tripolifosfato de sódio

4.3 Preparação da vacina inativada do VBI encapsulado em nanopartículas de quitosana (VBI-CS)

As nanopartículas foram formadas espontaneamente pelo método de gelificação ionotrópica (ZHAO et al., 2012). Para isso, 600 µL do LCA contendo a estirpe IBV/Brazil/PR05 inativada foram adicionados gota a gota em cinco mL de quitosana 0,05%, pH 4,5, sob agitação máxima em agitador magnético. A mistura foi incubada por 5 min sob agitação à temperatura ambiente. Então, um mL de TPP 0,1% foi adicionado gota a gota e a solução incubada por mais 10 min.

As nanopartículas foram separadas por centrifugação a 10.000 g/min por 30 min a 4°C e o sobrenadante foi armazenado. As nanopartículas foram

ressuspendidas em um mL de água ultrapura. Após a ressuspensão, as nanopartículas foram liofilizadas e armazenadas em geladeira.

4.4 Características das nanopartículas VBI-CS

As características morfológicas do VBI-CS foram examinadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica da Universidade de São Paulo (USP - Ribeirão Preto). Uma gota do VBI-CS foi adicionada em uma grade de níquel revestida com Pioloform® e secada em temperatura ambiente para ser visualizada na MET (JEM-100CX II, JEOL Inc., Peabody, USA). A suspensão do VBI-CS foi fixada com 3% de glutaraldeído durante 24 h e pós-fixado com 1% de tetróxido de ósmio por 2 h a 4°C, e então desidratada em etanol seriado. A amostra foi adicionada em uma grade revestida com fita adesiva de carbono e em seguida revestida com ouro para ser analisada no MEV (JSN6610LV, JEOL Inc., Peabody, USA).

O tamanho das nanopartículas, o PDI e o potencial zeta foram medidos no aparelho analisador de tamanho de partículas ZetaSizer Nano ZS90 (Nano Series, Malvern Instrumentos Ltd, Worcestershire, UK). A EE foi avaliada pela dosagem de proteína não encapsulada presente no sobrenadante através da técnica de Bradford.

4.5 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

Foi realizado o protocolo descrito por Bento et al. (2015). Em suma, esses procedimentos envolveram a utilização de fibroblastos de embriões de galinha (FEG), que foram obtidos em condições assépticas de embriões provenientes de ovos de galinhas SPF, aos nove dias de incubação (HAM et al., 1993). As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de $4,5 \times 10^4$ células/poço contendo 200 μ L de meio de cultura HAM-F10 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e incubadas durante a noite. No dia seguinte, o meio de cultura foi substituído por 100 μ L de meio fresco e então, foram adicionados 100 μ L da preparação de nanopartículas de VBI-CS. Após 24 h de incubação, o meio de cultura contendo o VBI-CS foi descartado e então foram adicionados 180 μ L de meio de cultura contendo 20 μ L de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio - 5

mg/mL - Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). As placas foram incubadas durante 3 h à 37°C. O meio de cultura contendo MTT foi descartado e os cristais que se formaram foram dissolvidos com isopropanol acidificado. A densidade óptica foi medida com um filtro de 570 nm.

A viabilidade das células não tratadas (controle) foi definida como 100% e a viabilidade celular relativa tratada com VBI-CS foi calculada utilizando a equação: $[A]_{\text{test}} / [A]_{\text{control}} \times 100$.

4.6 Preparação da vacina inativada incorporada ao adjuvante oleoso Montanide ISA 71

O LCA contendo a estirpe IBV/Brazil/PR05 inativada foi incorporado à mistura de adjuvante oleoso Montanide ISA 71 VG® (SEPPIC, Paris, França) (VBI-O) para obter a emulsão água *in* óleo na proporção 70% do adjuvante mais 30% do vírus inativado, conforme as recomendações do fabricante Seppic.

4.7 Delineamento experimental *in vivo*

Foram utilizados 162 pintinhos SPF da linhagem Leghorn Branca com um dia de vida. Esses pintinhos foram distribuídos em seis grupos experimentais (Tabela 2), os quais foram alojados separadamente em isoladores com pressão positiva instalados na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Suínos e Aves, Concórdia - SC. Os animais receberam água e comida à vontade durante todo o experimento.

No 1º dia de vida, aves de dois dos grupos experimentais foram vacinadas com uma vacina “viva” atenuada comercial contendo a estirpe H120 do VBI por via óculo-nasal na dose preconizada pelo fabricante. Aos 14 dias de vida estes dois grupos primo-vacinados receberam um reforço, um grupo foi com a vacina inativada VBI-CS via oculo-nasal (VBI-CS/ ON; grupo V+Nano) e o outro com a vacina inativada VBI-O administrada por via intramuscular (VBI-O/ IM; grupo V+Óleo). Outros dois grupos de aves foram primo-vacinados aos 14 dias de vida, um grupo com a vacina VBI-CS/ ON (grupo Nano) e o outro com a VBI-O/ IM (grupo Óleo). Aves desses quatro grupos foram desafiadas por via óculo-nasal com a estirpe IBV/Brazil/PR05 ($10^{4,5}$ DIE50/mL) aos 31 dias de vida. Um quinto grupo de aves foi

mantido como grupo controle positivo (grupo CP) da infecção, sendo este não imunizado e desafiado aos 31 dias de vida com a mesma estirpe. Por fim, um último grupo foi mantido como controle negativo da infecção (grupo CN), submetido à inoculação de nanopartículas de quitosana sem o vírus aos 14 dias de vida e meio de cultura DMEM aos 31 dias de vida.

As aves foram vacinadas com a mesma dose de vírus inativado (aproximadamente $10^{8,285}$ DIE50/ mL) para cada uma das preparações de vacina inativadas testadas (VBI-CS, ou VBI-O). As aves vacinadas com as nanopartículas de quitosana receberam 100 μ L da suspensão do vírus encapsulado por via ocular-nasal, enquanto as aves vacinadas com o vírus incorporado ao adjuvante oleoso Montanide ISA 71 VG receberam 300 μ L da vacina por via intramuscular (músculo peitoral).

Um dia antes da infecção, foram colhidas amostras de soro e lágrima de 10 aves de cada grupo. Sete aves dos grupos controles e dez aves de cada um dos grupos vacinados foram submetidas à eutanásia nos intervalos de 1, 5 e 11 dias pós-infecção (dpi) para a colheita de amostras.

Tabela 2. Delineamento experimental *in vivo*.

Grupo (nº animais)	Vacina viva atenuada H120	Vacina inativada	Desafio
Idade	1º dia	14º dia	31º dia
V+Nano (30 aves)	H120	VBI-CS/ON*	IBV/Brazil/PR05
V+Óleo (30 aves)	H120	VBI-O-IM**	IBV/Brazil/PR05
Nano (30 aves)	-	VBI-CS/ON	IBV/Brazil/PR05
Óleo (30 aves)	-	VBI-O-IM	IBV/Brazil/PR05
CP (21 aves)	-	-	IBV/Brazil/PR05
CN (21 aves)	-	Nanopartículas de quitosana	Meio DMEM

Grupo Nano: aves vacinadas aos 14 dias de idade VBI-CS/ ON; Grupo Óleo: aves vacinadas aos 14 dias de idade VBI-O/ IM; Grupo V+Nano: aves vacinadas no primeiro dia de vida com uma vacina viva atenuada comercial H120 por via óculo-nasal, seguida da vacinação aos 14 dias de idade com a vacina VBI-CS/ ON; Grupo V+Óleo: aves vacinadas no primeiro dia de vida com uma vacina viva atenuada comercial H120 por via óculo-nasal, seguida da vacinação aos 14 dias de idade com a vacina VBI-O; *VBI-CS/ ON: vacina inativada do VBI encapsulada por nanopartículas de quitosana administrada por via oculo-nasal; **VBI-O/ IM: vacina inativada incorporada a mistura do adjuvante Montanide ISA 71 administrada por via intramuscular.

4.7.1 Avaliação da ciliostase traqueal

As traqueias colhidas no 5º dpi foram submetidas à avaliação da ciliostase. Cada traqueia foi dividida em três fragmentos (proximal, medio e distal), e a partir de cada fragmento foram avaliados três anéis traqueais, totalizando nove anéis por ave. A avaliação da percentagem de movimento ciliar de cada anel foram classificadas nos seguintes escores: 0= 100% dos cílios batendo; 1= $\geq 75\%$ dos cílios batendo; 2= $\geq 50\%$ dos cílios batendo; 3= $\geq 25\%$ dos cílios batendo; 4= $< 25\%$ dos cílios batendo (DARBYSHIRE, 1980). O escore foi dado individualmente para três cortes de cada região e a média desses escores para cada traqueia foi calculada. O escore de proteção de cada grupo foi determinado segundo a fórmula utilizada por Jackwood et al. (2015), sendo que o grupo com o escore de ciliostase traqueal ≥ 50 foi considerado protegido.

Além disso, foi determinado o número de aves com ciliostase per total no grupo seguindo os critérios determinados pela Farmacopeia Europeia (Farmacopeia

Europeia 8.0), sendo que o anel traqueal com 50% ou mais dos cílios batendo foi considerado negativo, e uma ave era considerada protegida quando 90% ou mais dos seus anéis traqueais apresentavam atividade normal. O protocolo vacinal foi considerado eficaz quando 80% ou mais das aves dos grupos estavam protegidas.

4.7.2 Avaliação das lesões microscópicas

Para analisar as lesões microscópicas, foram realizados exames histopatológicos por meio de colheita de fragmentos de traqueia, pulmão, rim e gônadas no 5^o e 11^o dpi. As amostras foram colocadas em solução de formol 10% tamponado com fosfato, pH 7,2, na proporção de 20:1 (solução fixadora: fragmentos de órgãos), onde permaneceram pelo tempo mínimo de 24 h. Os fragmentos foram processados por técnicas histológicas usuais de fixação, desidratação, diafanização, e então, cortados em 4 µm de espessura e corados com Hematoxilina-Eosina (HE). A análise histológica foi realizada utilizando-se um microscópio de luz equipado com câmera digital (NYKON ECLIPSE E 200 x COOLPIX 5400). As lesões dos órgãos foram classificadas em escores de lesões microscópicas (CHEN et al., 1996; FERNANDO et al., 2013; NAKAMURA et al., 1991).

4.7.3 Extração de RNA

Foram colhidas amostras da traqueia (1, 5 e 11 dpi) e do rim (5 e 11 dpi) para a extração do RNA viral e genômico. O RNA foi extraído com o reagente Lise QIAzol (Qiagen, West Sussex, UK) seguido pela purificação do RNA com o RNeasy mini-kit (Qiagen, Crawley, UK), de acordo com os protocolos recomendados pelos fabricantes. O RNA extraído foi quantificado a 260 nm, utilizando Nanodrop® ND 1000 - Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) e a integridade do RNA foi analisada em gel de agarose a 1% e pelo kit nano Agilent RNA 6000 (Agilent Technologies, South Queensferry, UK) utilizando o aparelho Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, South Queensferry, UK) para determinar o NIR (Número de integridade do RNA). O RNA foi armazenado em ultra-freezer a -80°C até o processamento.

4.7.3.1 Quantificação da carga viral

O RNA foi submetido à quantificação da carga viral pela técnica de RT-PCR quantitativo em tempo real utilizando o kit RT-PCR One-Step AgPath-ID (Ambion, Applied Biosystems, Foster City, USA), usando-se os primers e sonda para amplificação de um fragmento da região 3'UTR do VBI, descritos anteriormente (CHOUSALKAR; CHEETHAM; ROBERTS, 2009). A reação foi realizada no aparelho 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA), na qual utilizou-se 10 µmol de cada primer e sonda, 12,5 µL de Buffer 2X RT-PCR, 2 µL de água livre de RNase e DNase, 1 µL do Mix de Enzima 25X RT-PCR e 8 µL de RNA (25 ng/ µL), totalizando um volume de reação de 25 µL. As amostras foram analisadas em duplicata. Os parâmetros de ciclagem foram 50°C/ 15 min, em seguida 95°C/ 5 min, seguido por 45 ciclos compostos por uma etapa a 95°C/ 15 segundos (seg) e 62°C/ 35 seg. Os resultados do Cq (quantificação de ciclos) foram usados para calcular o log do número de cópias de RNA (Log10) com base na equação linear de uma curva padrão. A curva padrão foi gerada através da diluição seriada com o número de cópias de uma preparação conhecida do RNA do VBI e obtendo-se o Cq de cada diluição, conforme descrito por Okino et al. (2017).

4.7.3.2 Análise da expressão dos genes associados às respostas imunes citomediadas

Após a extração, o RNA foi submetido à síntese de cDNA por meio da técnica de transcrição reversa (RT) com o uso de Oligo DT (Invitrogen, Carlsbad, USA) e dos reagentes do kit da enzima MMLV (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

O cDNA obtido foi submetido à técnica quantitativa de PCR (qPCR) (OKINO et al., 2017) para fazer a quantificação da expressão de genes de RIC da cadeia β do CD8⁺, dos genes da Granzima A, Perforina-1 e do IFN γ . Em resumo, a expressão relativa de todos os genes associados à RIC testados em amostras traqueais e de rins de galinhas, vacinadas ou não, e infectadas com a estirpe virulenta homóloga do VBI foi quantificada como o número de vezes de alterações (“fold changes”) em relação ao grupo não infectado (CN; não vacinado e não infectado). Os valores de expressão gênica foram normalizados com base nos genes constitutivos GAPDH e

TOP2B, usando-se as aves do grupo CN para determinar os níveis basais de expressão gênica (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; OKINO et al., 2017).

Os primers utilizados na reação de RT-qPCR estão descritos na Tabela 3, sendo que os primers GAPDH e Perforina-1 foram desenhados usando o software Primer3 [<http://frodo.wi.mit.edu>], utilizando-se as junções exon-exon, de acordo com as sequências dos genes depositadas no Ensembl [<http://ensembl.org>]. As reações foram conduzidas no aparelho 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) utilizando o kit PCR SYBR Green QuantFast (Qiagen, Crawley, UK). O mix continha 3 pmol de cada primer, 7,5 µL do Mix de Enzima 2X QuantiFast, 4,9 µL de água e 2 µL de cDNA (10 ng/ µL), totalizando uma reação de 15 µL. Foram realizadas duplicatas das reações para cada amostra. Em cada placa foram testadas também duplicatas do controle positivo e do controle negativo da reação. Os parâmetros de ciclagem foram 95°C/ 5 min, seguido por 45 ciclos constituídos por uma etapa de 95°C/ 15 seg e 60°C/ 35 seg, finalizando com a curva de Melting (95°C/ 15 seg, 60°C/ 1 min, 95°C/ 30 seg e 60°C/ 15 seg).

Tabela 3. Sequências de primers usados no RT-qPCR para quantificação relativa.

Gene	Primers (5'-3')	Número de acesso	Localização(nt)	Tamanho	Junção exon-exon	Eficiência	Y-int
GAPDH ^a	Forward: AGCTGAATGGGAAGCTTACTGG Reverse: GCAGGTCAGGTCAACAACAGAG	NM_204305.1	719-792	74 bp	4/5	101.77	34.98
TOP2B ^b	Forward: AAGGCCAAGAAGATGGAACTG Reverse: TCTTGGATTTCTTGCATGGTGT	NM_205082.1	4748±4934	187 bp	35/36	91.46	30.668
CD8β ^b	Forward: CTGCATGGCTCCGACAATGG Reverse: ATCGACCACGTCAAGCTGGG	NM_205247.2	710-802	93bp	2/3	92.4496	31.8788
Granzima A ^b	Forward: GCGTAGCAGGATGGGGACAA Reverse: CCACCTGAATCCCCTCGACA	NM_204457.1	429-627	199bp	4/5	104.46	34.5033
Perforina-1 ^a	Forward: ACTGCGTGCACTACTGGATCTC Reverse: GGATGTAGTGGGTGCCGTATG	XM_004945690.1	673-822	150bp	1/2	95.68	37.702
IFNγ ^b	Forward: AGCCGCACATCAAACACATA Reverse: AAGTCGTTTCATCGGGAGCTT	NM_205149.1	374±488	115 bp	3/4	101.94	33.7428

^aDesenhado^bDescrito por Okino et al. (2017)

4.7.4 Detecção de anticorpos anti-VBI sistêmicos (soro sanguíneo) e locais (secreção lacrimal)

Foram colhidas das aves dos diferentes grupos experimentais amostras de soro e de lágrima no período que antecede o desafio e 1, 5 e 11 dpi. As amostras de secreção lacrimal foram colhidas por estimulação da mucosa ocular com uma gota de glicerol em cada olho. As avaliações dos títulos e da especificidade de anticorpos dos isótipos IgM e IgG presentes no soro sanguíneo e IgA e IgG presentes na lágrima das aves foram determinadas pelo método Sandwich-ELISA-Concanavalina A (BRONZONI et al., 2005; LANCELOTTI et al., 2014).

As amostras de lágrimas e soros foram diluídas em PBS (1:25 e 1:50, respectivamente). As concentrações dos reagentes utilizadas foram 1,5 mg/mL de Concanavalina A, diluição 1:2 do antígeno viral (estirpe VBI/Brasil/PR05) e conjugados com peroxidase (Bethyl Laboratories, Montgomery, US) anti-IgA de galinha a 1:2000, anti-IgG de galinha a 1:1000, ou anti-IgM de galinha a 1:800.

5. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados relativos a média dos escores de ciliostase foram analisados estatisticamente pelo Teste de Tukey. Para avaliar os níveis dos isótipos de anticorpos anti-VBI detectados no S-ELISA-ConA, os níveis de carga viral e da expressão gênica dos genes de respostas imunes cito-mediadas foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns. As correlações entre os parâmetros das respostas imunes (anticorpos e expressão de genes da RIC) no 5º dpi e os parâmetros das lesões patológicas (ciliostase e carga viral da traqueia e do rim) foram calculadas pelo método de Spearman. As correlações foram analisadas separadamente conforme o tratamento vacinal com diferentes adjuvantes (VBI-CS ou VBI-O). Todos os testes foram aplicados o intervalo de confiança (IC) de 95% e foram considerados estatisticamente significativos aqueles com os níveis descritivos inferiores a 0,05. Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism v.6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

6. RESULTADOS

6.1 Vírus

O título infectante viral em ovos embrionados SPF foi de $10^{8.285}$ Doses Infectantes Embrionárias 50% (DIE50)/ mL (REED; MUENCH, 1938).

A inativação viral foi confirmada através da inoculação em ovos embrionados por meio de passagens seriadas do vírus, nos quais foram obtidos embriões vivos e sem alterações macroscópicas significantes.

6.2 Otimização das nanopartículas

Inicialmente, buscou-se padronizar a concentração de ácido acético para dissolver a quitosana e o melhor pH da solução de quitosana para formulação das nanopartículas. Foi constatado que a melhor concentração de ácido acético foi de 3% e o melhor pH foi 4,5, pois não houve formação de precipitados após a adição de TPP, apresentando ao final do protocolo de preparação uma solução límpida, sem agregados.

Os resultados dos testes realizados com as diferentes concentrações de quitosana e TPP e diferentes volumes de TPP para otimização das nanopartículas estão descritos na Tabela 4. O resultado da EE também foi confirmado por RT-PCR convencional (Figura 2).

Entre os testes realizados para a otimização das nanopartículas de quitosana para encapsular o VBI, o que se mostrou melhor para a preparação da vacina VBI-CS foi o de número 6, pois apresentou os melhores parâmetros de EE, tamanho e PDI.

Tabela 4. Resultados da otimização das nanopartículas.

Formulação	EE (%)	RT-PCR	Tamanho das partículas (nanômetros)	PDI
1	80	✓	399	0.437
2	84	✓	402	0.481
3	80	✓	388	0.444
4	82	✓	339	0.398
5	75	✓	228	0.432
6	85	✓	256	0.307
7	75	✓	241	0.383
8	82	✓	293	0.342

PDI: Índice de polidispersão; ✓: Confirmação da eficiência de encapsulamento pela detecção do RNA genômico viral pela técnica RT-PCR; EE: eficiência de encapsulamento.

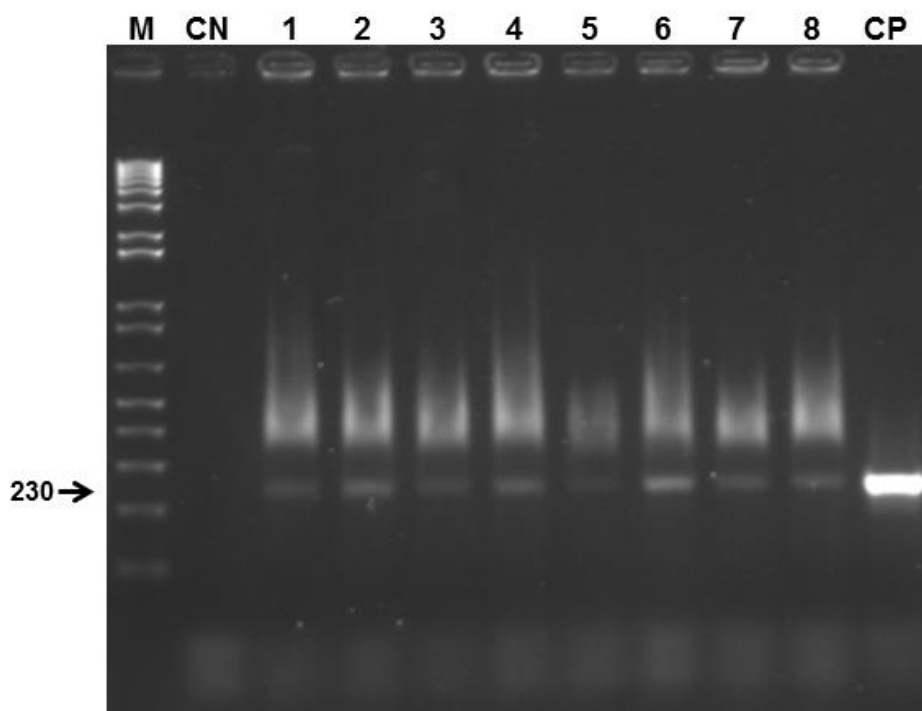


Figura 2. Diferentes formulações para otimização das nanopartículas. Legenda: (M) Marcador 100 bp; (CN) Controle Negativo; (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) Diferentes formulações de nanopartículas, conforme Tabela 1; (CP) Controle Positivo.

6.3 Características das nanopartículas VBI-CS.

Foram feitas 10 formulações para serem administradas nas aves. A média de encapsulamento das formulações foi de 85%, o tamanho de 286 nanômetros (nm), o PDI de 0,311 e do potencial Zeta de +19,9 mV. As nanopartículas apresentaram forma esférica como demonstrado na Figura 3.

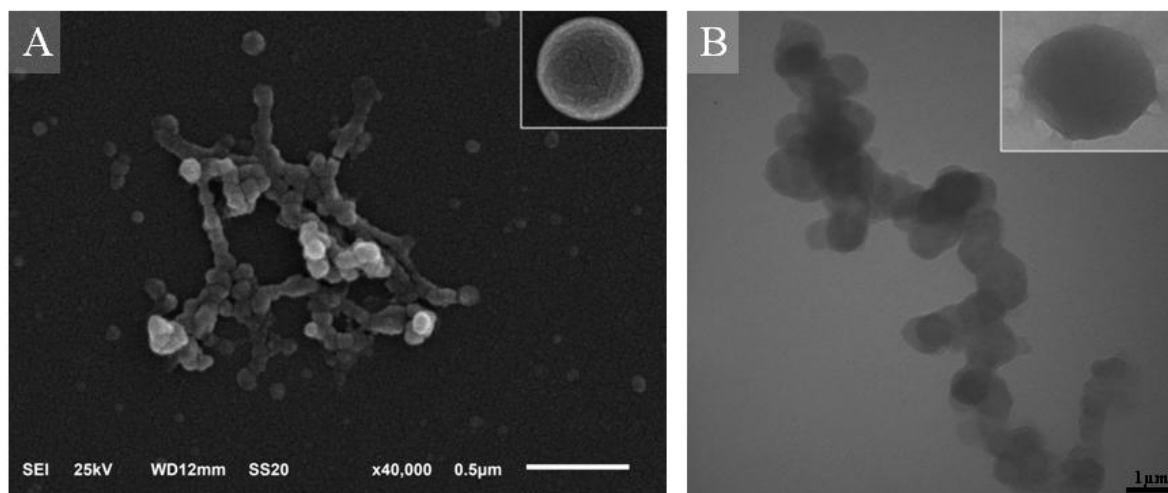


Figura 3. As nanopartículas de quitosana encapsulando o VBI (VBI-CS) apresentaram forma esférica, conforme observadas na (A) Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e (B) Microscopia eletrônica de transmissão (MET).

6.4 Citotoxicidade das nanopartículas

A taxa de sobrevivência dos FEG foi de $88,1\% \pm 3,23$ e não houve nenhuma alteração morfológica celular em comparação ao grupo controle, demonstrando que o VBI-CS apresentou baixa citotoxicidade *in vitro*.

Não foram detectadas nenhuma manifestação clínica ou lesões macroscópicas locais após a administração da vacina VBI-CS por via óculo-nasal nas aves experimentalmente imunizadas.

6.5 Avaliação da eficácia da vacina VBI-CS e comparação com a vacina inativada incorporada a um adjuvante convencional

6.5.1 Ciliostase

Os grupos de aves que apresentaram escore de proteção contra a ciliostase traqueal ≥ 50 foram considerados protegidos contra o desafio com a estirpe virulenta

homóloga IBV/Brazil/PR05, segundo os critérios preconizados por Jackwood et al. (2015). As aves vacinadas apenas com uma dose da vacina VBI-CS (grupo Nano) ou aquelas vacinadas com a associação da vacina VBI-CS precedidas da administração da vacina viva atenuada comercial contendo a estirpe H120 (grupo V+Nano) apresentaram um escore de proteção em termos de atividade ciliar de 65% e 66,7%, respectivamente, enquanto aquelas aves vacinadas com a vacina incorporada a um adjuvante oleoso (Montanide) associada a vacina viva atenuada (grupo V+Óleo) apresentaram um escore de proteção de 66,7%. Esses grupos foram considerados protegidos contra o desafio com a estirpe homóloga. As aves do grupo controle negativo (grupo CN) apresentaram total integridade de cílios (escore de proteção de 100%). Entretanto, as aves vacinadas apenas com a vacina contendo o adjuvante oleoso (grupo Óleo) ou aquelas não vacinadas e desafiadas (grupo CP) apresentaram um escore de proteção de 45% e 25%, respectivamente. Portanto, esses dois últimos grupos não foram considerados protegidos contra o desafio pela estirpe homóloga e virulenta do VBI.

As aves dos grupos CN, Nano, V+Nano e V+Óleo também foram consideradas protegidas segundo as recomendações da Farmacopeia Europeia, apresentando 100%, 90%, 89% e 89% de animais com atividade traqueal normal, respectivamente. Enquanto as aves dos grupos CP e Óleo apresentaram 0% e 33% de atividade ciliar normal da traqueia e, portanto, não foram consideradas protegidas contra o desafio com a estirpe do VBI.

A média de escores da ciliostase traqueal foi avaliada pelo teste de Tukey, entre os grupos de aves (Figura 4). Todas as aves desafiadas (vacinadas ou não) apresentaram diferenças significativas em relação às aves do grupo CN ($P \leq 0,05$). As aves dos grupos Nano, V+Nano e V+Óleo apresentaram menores escores de ciliostase do que as aves dos grupos CP e Óleo ($P \leq 0,05$).

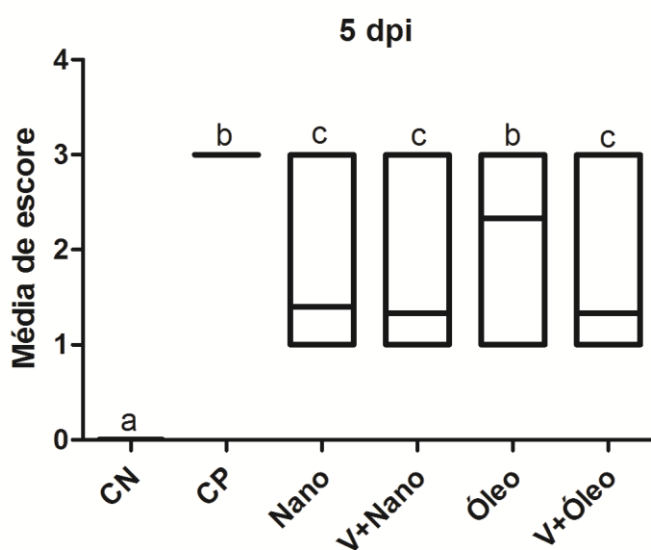


Figura 4. Médias de escores da ciliostase traqueal (representada pelos traços sozinhos ou dentro das caixas do gráfico, que representam a amplitude variação dos escores observados) das aves do grupo CN, CP, Nano, V+Nano, Óleo, V+Óleo. Letras diferentes representam diferenças significativas pelo Teste de Tukey entre os grupos de aves ($P \leq 0,05$). CN: aves do controle negativo; CP: aves do grupo controle positivo; Nano: aves vacinadas com VBI-CS; V+Nano: aves vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-CS; Óleo: aves vacinadas VBI-O; V+Óleo: aves vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-O.

6.5.2 Avaliação das lesões microscópicas

As lesões microscópicas nas traqueias, pulmões, rins e gônadas das aves de cada grupo foram avaliadas no 5º e 11º dpi (Tabela 5) e as alterações patológicas são mostradas na Figura 5.

A maioria dos animais (80-100%) dos grupos CP, Óleo e V+Óleo apresentaram lesões acentuadas (escores 2-3) na traqueia, enquanto que 60 a 70% dos animais dos grupos Nano e V+Nano não apresentaram lesões ou apresentaram lesões mais brandas (escore de 0-1) no 5º dpi. As lesões nos grupos CP, Óleo e V+Óleo permaneceram acentuadas em alguns animais, no 11º dpi, sendo que 50% ou mais das aves apresentaram lesões com escore de 2 e 3, enquanto 50% ou

mais dos animais dos grupos Nano e V+Nano não apresentaram alterações histopatológicas ou apresentaram lesões com escore 1. Entre as principais alterações microscópicas na traqueia estavam deciliação, infiltrado linfoide, congestão e perda das glândulas mucosa.

As principais lesões histológicas encontradas no pulmão foram infiltrado inflamatório misto com predominância de células mononucleares, inflamação perivascular e hiperplasia de folículos linfoides. As lesões mais acentuadas (escore 2-3) foram encontradas nos animais dos grupos CP e Óleo (60 a 70% das aves), enquanto 50% ou mais das aves dos grupos Nano, V+Nano e V+Óleo não apresentaram nenhuma alteração ou tiveram lesões de grau 1, no 5^o e 11^o dpi.

No rim, as lesões microscópicas mais encontradas foram degeneração de células cúbicas tubulares, necrose tubular, infiltrado com predominância de células monoculares e congestão vascular. Cinquenta por cento ou mais dos animais dos grupos CP, Óleo e V+Óleo apresentaram lesões mais acentuadas (escore 2-3) nos rins, enquanto 60% ou mais dos animais dos grupos Nano e V+Nano não apresentaram alterações histopatológicas ou revelaram alterações histopatológicas de escore 1, no 5^o e 11^o dpi.

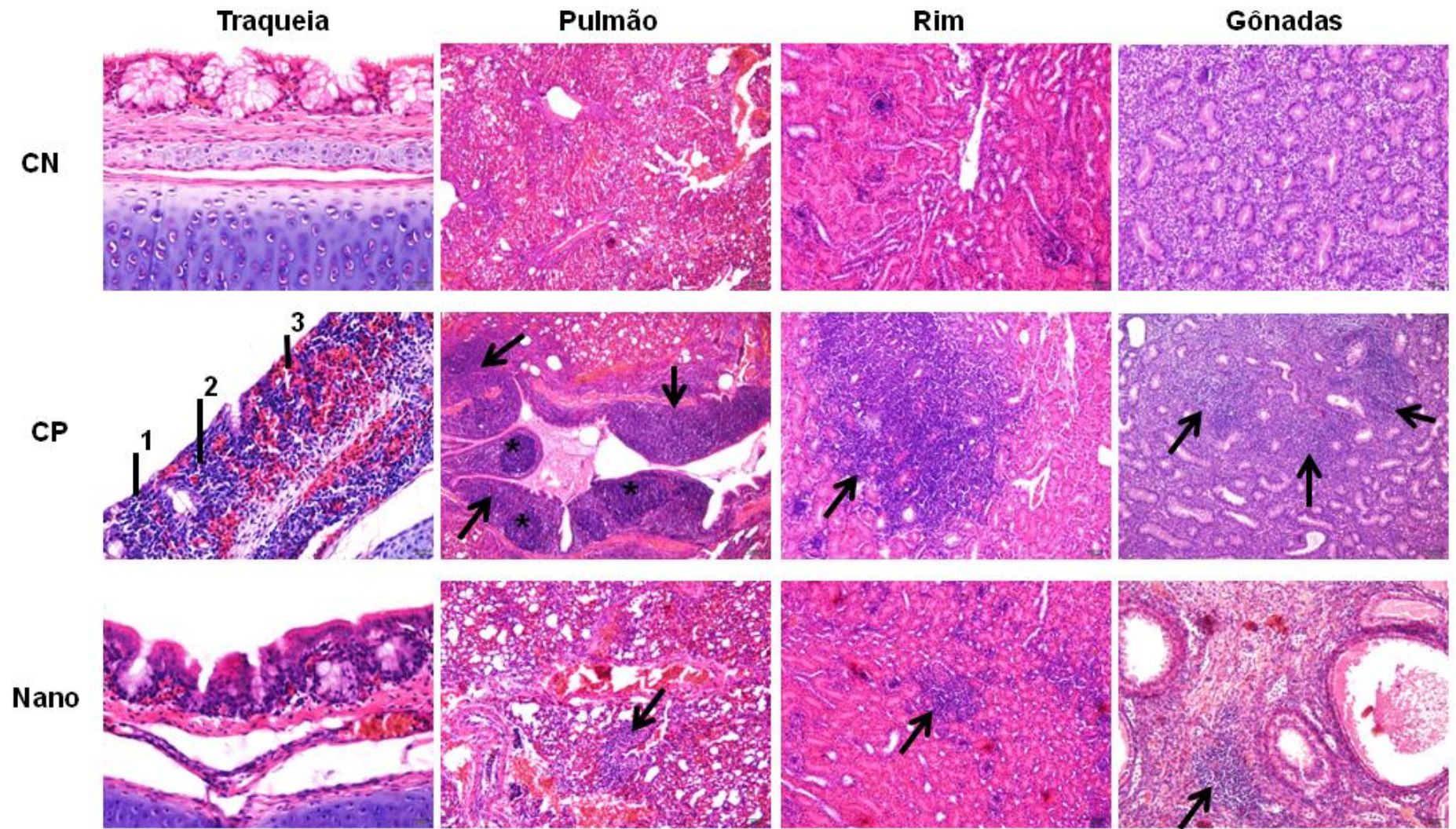
Infiltrado linfoide foi à única alteração observada, no 5^o e 11^o dpi, nas gônadas; tanto feminina quanto masculina. Entretanto, um número inferior de animais de todos os grupos apresentou essa lesão, que variou de escore 1 até 3. Setenta por cento ou mais dos animais de todos os grupos desafiados não apresentaram nenhuma alteração histopatológica nas gônadas.

Os animais do controle negativo não apresentaram nenhuma alteração histológica na traqueia, pulmão, rim ou gônadas.

Tabela 5. Número de aves apresentando diferentes escores de alterações microscópicas em traqueia, pulmão, rim e gônadas no 5º e 11º dpi.

		Escore de lesões microscópicas															
		Traqueia				Pulmão				Rim				Gônadas			
Grupos		0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
5 dpi	CN	7/7	-	-	-	7/7	-	-	-	7/7	-	-	-	7/7	-	-	-
	CP	-	-	1/7	6/7	1/7	1/7	4/7	1/7	-	3/7	3/7	1/7	2/7	4/7	1/7	-
	Nano	2/10	4/10	4/10	-	3/10	5/10	2/10	-	4/10	3/10	3/10	-	8/10	1/10	1/10	-
	V+Nano	5/10	2/10	3/10	-	1/10	5/10	4/10	-	2/10	4/10	4/10	-	9/10	-	-	1/10
	Óleo	-	1/10	5/10	4/10	3/10	1/10	6/10	-	3/10	2/10	5/10	-	8/10	1/10	-	1/10
	V+Óleo	1/10	1/10	7/10	1/10	3/10	5/10	2/10	-	2/10	3/10	5/10	-	9/10	-	-	1/10
11 dpi	CN	7/7	-	-	-	7/7	-	-	-	7/7	-	-	-	7/7	-	-	-
	CP	-	3/7	4/7	-	1/7	1/7	5/7	-	1/7	1/7	5/7	-	4/7	1/7	1/7	1/7
	Nano	-	5/10	5/10	-	6/10	3/10	1/10	-	4/10	4/10	2/10	-	7/10	3/10	-	-
	V+Nano	5/10	1/10	4/10	-	2/10	5/10	2/10	1/10	6/10	2/10	2/10	-	9/10	-	1/10	-
	Óleo	1/10	3/10	4/10	2/10	1/10	2/10	3/10	4/10	1/10	2/10	6/10	1/10	10/10	-	-	-
	V+Óleo	5/10	-	4/10	1/10	3/10	2/10	4/10	1/10	3/10	2/10	3/10	2/10	8/10	1/10	-	1/10

Média de escore por ave foi avaliada; N° de aves apresentando a média de escore da lesão/ Total de aves infectadas; CN: grupo controle negativo; CP: grupo controle positivo; Nano: grupo de aves vacinadas com VBI-CS; V+Nano: grupo de aves vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida pela vacinação com VBI-CS; Óleo: grupo de aves vacinadas com uma vacina inativada contendo adjuvante oleoso; V+Óleo: grupo de aves vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida pela vacinação com a vacina inativada contendo adjuvante oleoso.



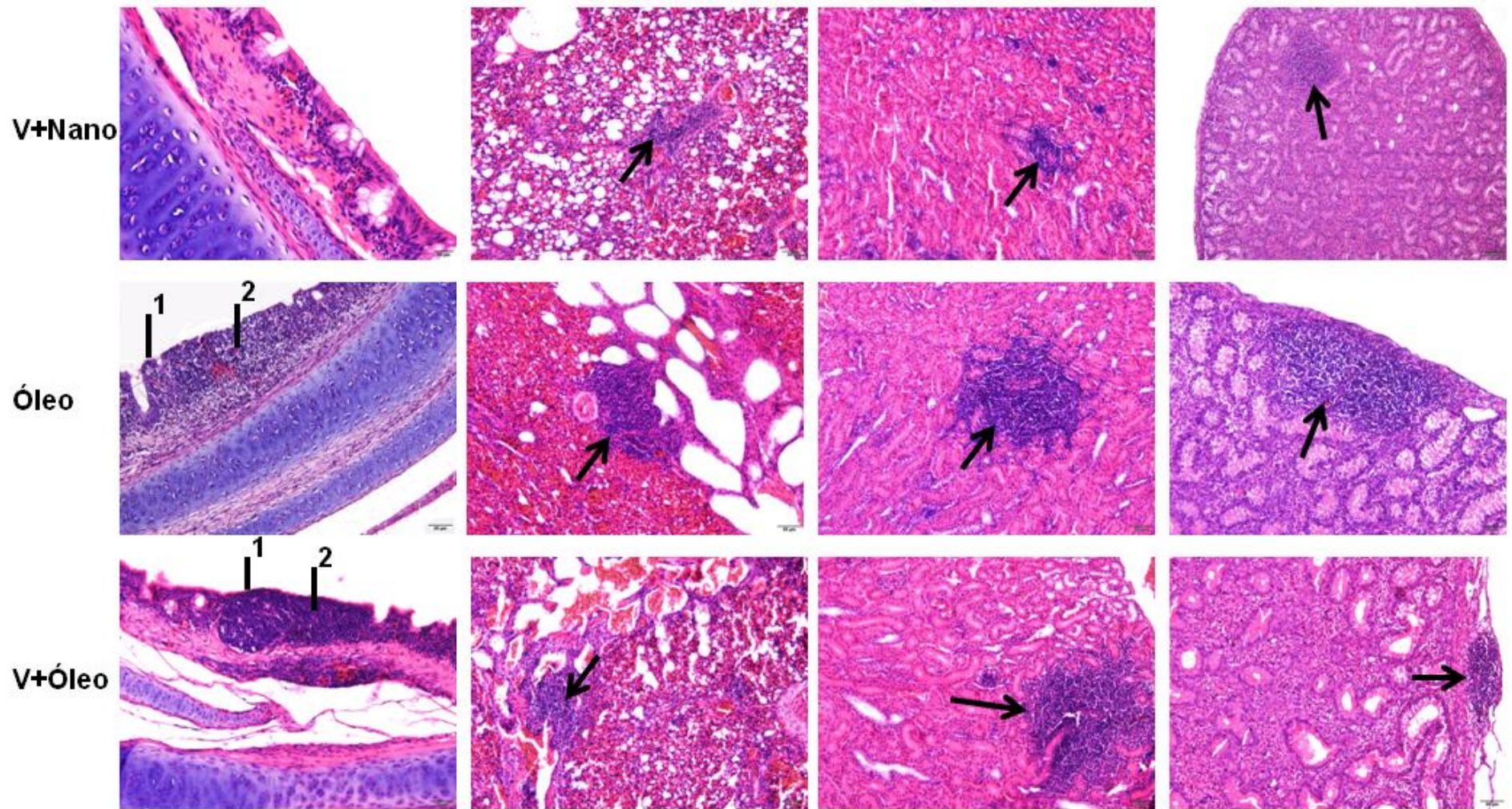


Figura 5. Alterações microscópicas em diferentes órgãos de aves do controle negativo (CN), controle positivo (CP), vacinadas com VBI-CS (Nano), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-CS (V+Nano), vacinadas com VBI-O (Óleo), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-O (V+Óleo). A barra número 1 indica perda da camada ciliar, 2 infiltrado inflamatório com predominância de células mononucleares, 3 congestão na traqueia. A seta (↑) indica infiltrado inflamatório com predominância de células mononucleares em rim, pulmão e gônada. O asterisco (*) indica hiperplasia de nódulos linfoides no pulmão.

6.5.3 Quantificação da carga viral

A equação linear gerada a partir da curva padrão foi de $y = -0,3084x + 12,69$ com coeficiente de determinação (R^2) = 0,9872 e foi usada para calcular o log do número de cópias de RNA (Log10). A eficiência do teste foi estimada em 103,4%.

Os resultados da carga viral na traqueia (1, 5 e 11 dpi) e no rim (5 e 11 dpi) são apresentados nas Figuras 6 e 7.

Na traqueia, o grupo CP apresentou diferença significativa da carga viral com relação ao grupo CN, no 1º dpi ($P \geq 0,05$). No 5º dpi, foram detectadas amostras positivas na traqueia de todos os animais desafiados, exceto em uma ave do grupo Nano. Os grupos CP, Óleo e V+Óleo apresentaram diferenças significativas de carga viral com relação ao grupo CN ($P \leq 0,05$). Os grupos Nano e V+Nano apresentaram uma quantidade inferior de carga viral na traqueia quando comparados ao grupo Óleo ($P \leq 0,05$). Além disso, o grupo Nano apresentou uma carga viral significativamente menor do que a do grupo CP ($P \leq 0,05$). No 11º dpi, os grupos CP, Nano e Óleo apresentaram diferenças significativas com relação ao grupo CN ($P \leq 0,05$), enquanto que os grupos V+Nano e V+Óleo tiveram uma menor carga viral na traqueia quando comparados ao grupo CP ($P \leq 0,05$).

No rim, o grupo CP apresentou diferenças significativas de carga viral em relação aos grupos CN, Nano, V+Nano e V+Óleo no 5º dpi ($P \leq 0,05$). Não houve diferença significativa das cargas virais detectadas nos rins das aves dos diferentes grupos experimentais no 11º dpi ($P \geq 0,05$).

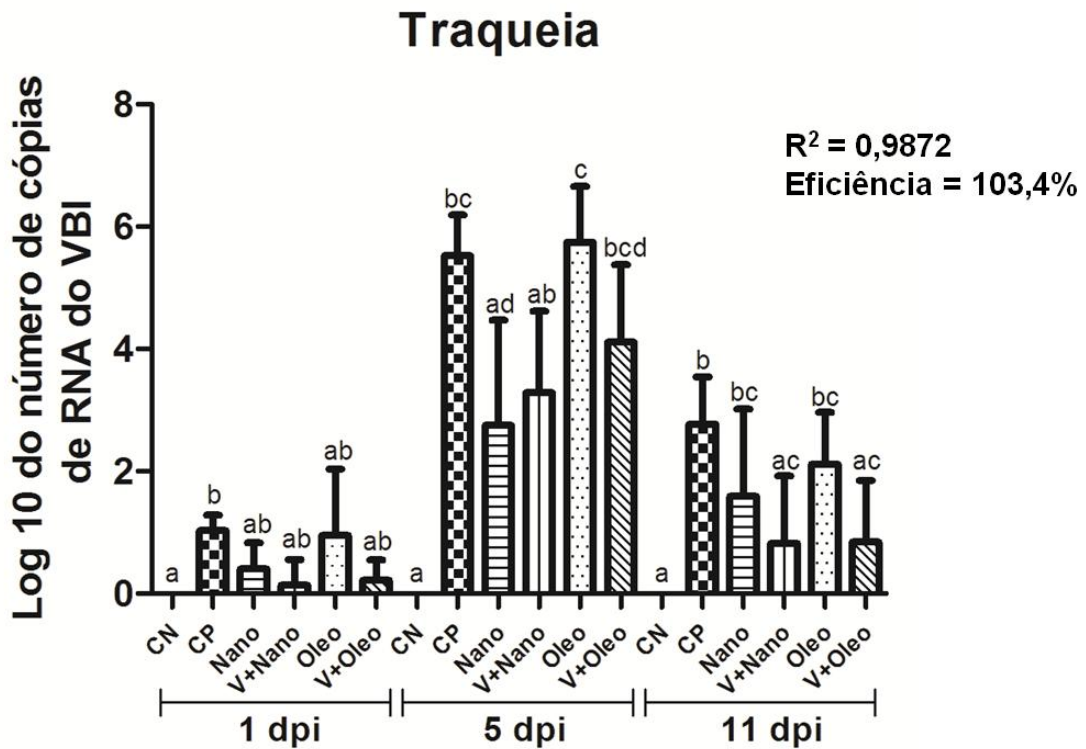


Figura 6. Média do Log₁₀ do número de cópias de RNA do VBI detectados nas traqueias e rins das aves do controle negativo (CN), controle positivo (CP), vacinadas com VBI-CS (Nano), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-CS (V+Nano), vacinadas com VBI-O (Óleo), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-O (V+Óleo). As diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn's estão representadas por letras diferentes entre os grupos ($P \leq 0,05$).

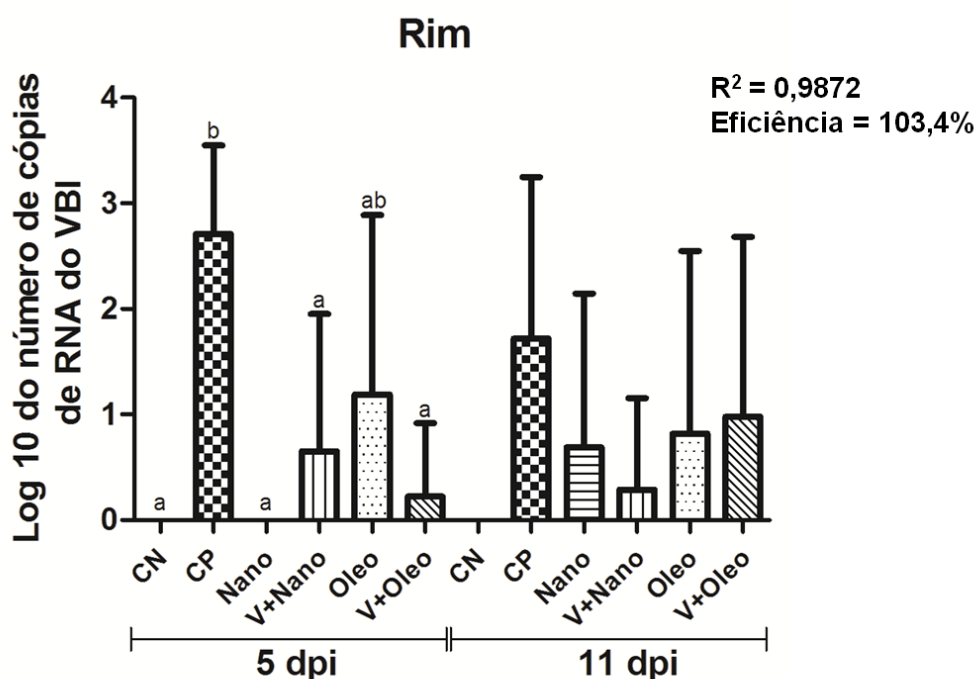


Figura 7. Média do Log₁₀ do número de cópias de RNA do VBI detectados nos rins das aves do controle negativo (CN), controle positivo (CP), vacinadas VBI-CS (Nano), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-CS (V+Nano), vacinadas com VBI-O (Óleo), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-O (V+Óleo). As diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn's estão representadas por letras diferentes entre os grupos ($P \leq 0,05$).

6.5.4 Avaliação das respostas imunes cito-mediadas

Os resultados da expressão do gene da cadeia β do marcador CD8⁺ de linfócitos T citotóxicos nas amostras de traqueia e rim das aves estão representados na Figura 8. Foi observado um aumento na expressão do gene CD8 β de linfócitos T citotóxicos na traqueia das aves do grupo Nano no 1^o dpi, o qual revelou diferença significativa com relação aos grupos CN, CP e Óleo ($P \leq 0,05$). No 5^o dpi, o grupo V+Nano apresentou maior nível na expressão de CD8⁺ quando comparado ao grupo CN ($P \leq 0,05$), enquanto no 11^o dpi, houve uma diminuição na expressão desse mesmo marcador. No mesmo intervalo foram encontradas diferenças significativas entre os grupos CN e V+Nano com o grupo V+Óleo ($P \leq 0,05$).

No rim, os níveis de expressão do gene do marcador CD8 β foram menores e também não foram observadas diferenças significativas no 5º dpi entre os grupos ($P \geq 0,05$). Já, no 11º dpi, houve um aumento na expressão do gene do marcador CD8 β nas aves do grupo V+Nano, sendo que este grupo apresentou diferença significativa com os grupos Óleo e V+Óleo ($P \leq 0,05$).

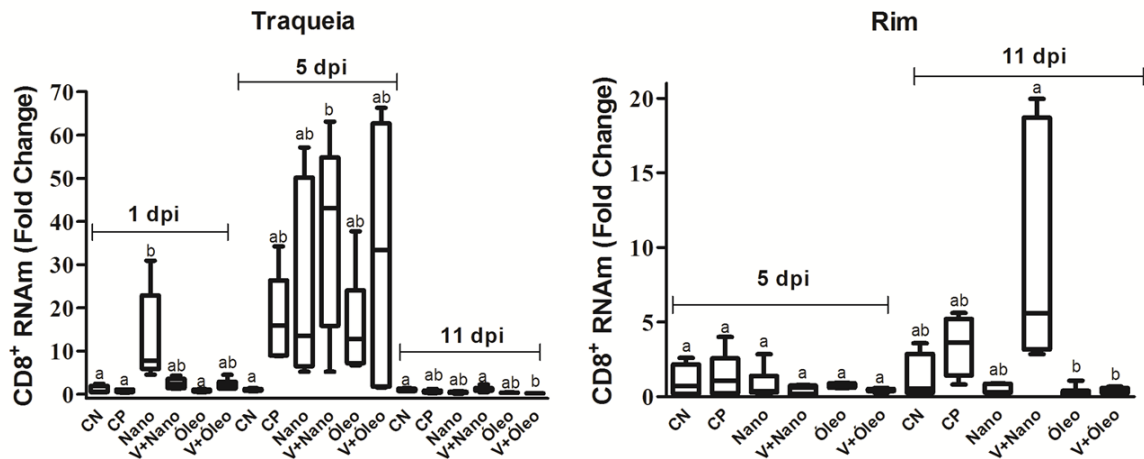


Figura 8. Expressão do gene da cadeia β do marcador CD8+ de linfócitos T citotóxicos (mensurado como média do número de vezes de alteração – “fold changes” em relação ao CN) nas amostras de traqueia e rim das aves do controle negativo (CN), controle positivo (CP), vacinadas com VBI-CS (Nano), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-CS (V+Nano), vacinadas com VBI-O (Óleo), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-O (V+Óleo). As diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn’s estão representadas por letras diferentes entre os grupos ($P \leq 0,05$).

Os resultados da expressão do gene da Granzima homóloga A nas amostras de traqueia e rim das aves estão apresentados na Figura 9. Pode-se observar que houve uma maior expressão do gene da Granzima A na traqueia de aves do grupo Nano no 1º dpi, quando comparado aos grupos CN, CP e Óleo ($P \leq 0,05$). No 5º dpi, os grupos Nano, V+Nano e V+Óleo apresentaram diferenças significativas na expressão do gene da Granzima A comparadas ao grupo CN ($P \leq 0,05$). No 11º dpi, houve diminuição da expressão do gene da Granzima A na traqueia de todos os

grupos de animais desafiados (vacinados ou não), porém o grupo Nano apresentou maior nível na expressão desse gene quando comparado aos grupos CN e Óleo ($P \leq 0,05$).

Os níveis de expressão do gene da Granzima A foram bem menores no rim e não houve diferenças significativas na expressão desse gene para esse órgão, no 5º dpi e 11º dpi ($P \geq 0,05$), entre os grupos estudados.

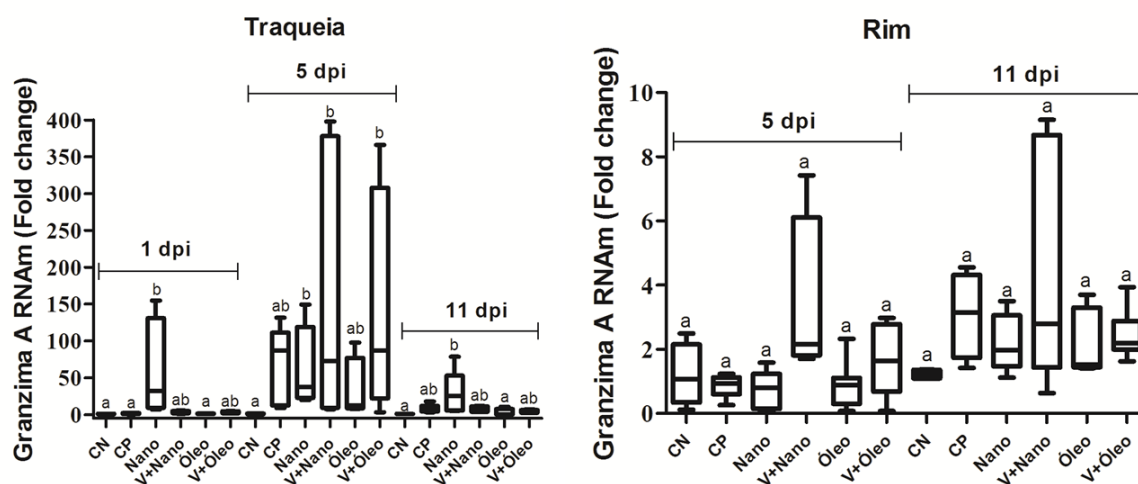


Figura 9. Expressão do gene Granzima homóloga A (mensurado como média do número de vezes de alteração – “fold changes” em relação ao CN) nas amostras de traqueia e rim das aves do controle negativo (CN), controle positivo (CP), vacinadas com VBI-CS (Nano), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-CS (V+Nano), vacinadas com VBI-O (Óleo), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-O (V+Óleo). As diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn’s estão representadas por asteriscos ($P \leq 0,05$).

Os resultados de expressão do gene IFN γ encontram-se na Figura 10. No 1º dpi, verifica-se que foi maior a expressão de IFN γ para o grupo Nano quando comparado com os grupos CN e CP ($P \leq 0,05$). No 5º dpi, ocorreu um aumento na expressão do gene do IFN γ em todos os grupos desafiados, apesar da diferença significativa ter sido registrada apenas entre os grupos V+Nano e CN ($P \leq 0,05$). No intervalo seguinte (11º dpi), houve uma queda na expressão do gene do IFN γ nos

grupos desafiados com o VBI (vacinação ou não), embora o nível de expressão tenham sido maior para o grupo CN quando comparado ao grupo V+Óleo ($P \leq 0,05$).

Quanto às amostras de rim, os níveis de expressão de IFN γ foram bem menores e não foi encontrada diferença significativa na expressão do gene do IFN γ no 5º dpi ($P \geq 0,05$). Já, no 11º dpi, também houve uma baixa expressão do gene de IFN γ , sendo que o grupo CN apresentou diferença significativa com relação aos grupos Óleo e V+Óleo ($P \leq 0,05$), cujos níveis de expressão desse gene foram menores do que nas aves do grupo CN.

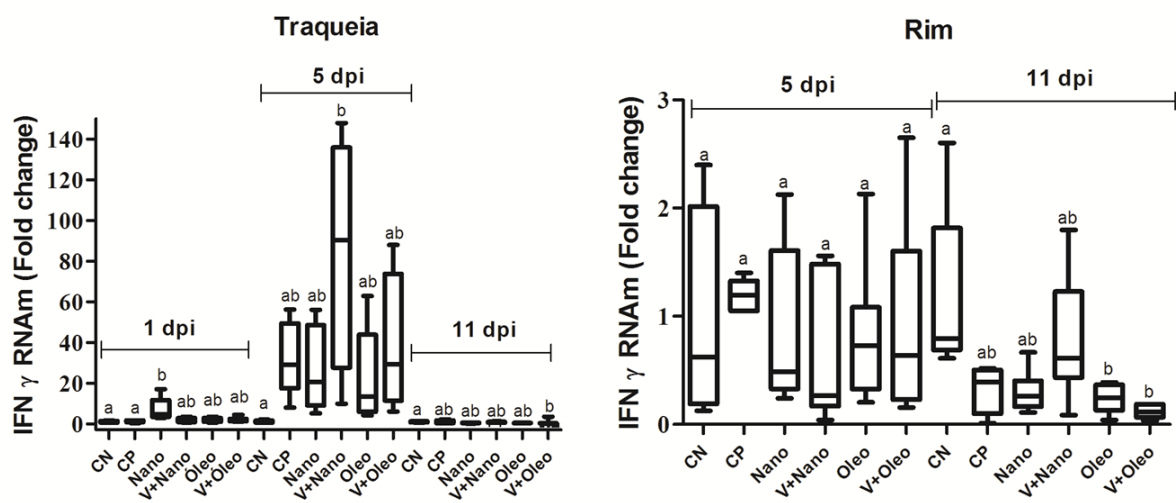


Figura 10. Expressão do gene IFN γ (mensurado como média do número de vezes de alteração – “fold changes” em relação ao CN) nas amostras de traqueia e rim das aves do controle negativo (CN), controle positivo (CP), vacinadas com VBI-CS (Nano), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-CS (V+Nano), vacinadas com VBI-O (Óleo), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-O (V+Óleo). As diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn’s estão representadas por letras diferentes entre os grupos ($P \leq 0,05$).

Os resultados da expressão do gene da Perforina 1 nas amostras de traqueia e rim das aves dos diferentes grupos experimentais testados estão dispostos na Figura 11. Não houve diferença significativa entre os grupos na expressão do gene da Perforina na traqueia tanto no 1º como no 11º dpi ($P \geq 0,05$). No 5º dpi, o grupo

Óleo apresentou nível de expressão do gene da Perforina mais elevado quando comparado ao grupo CN ($P \leq 0,05$).

Foi observada para as amostras de rim diferença significativa na expressão do gene da Perforina apenas no 5º dpi, de forma que as aves do grupo V+Óleo apresentou maior expressão no nível desse gene do que o grupo CP ($P \leq 0,05$).

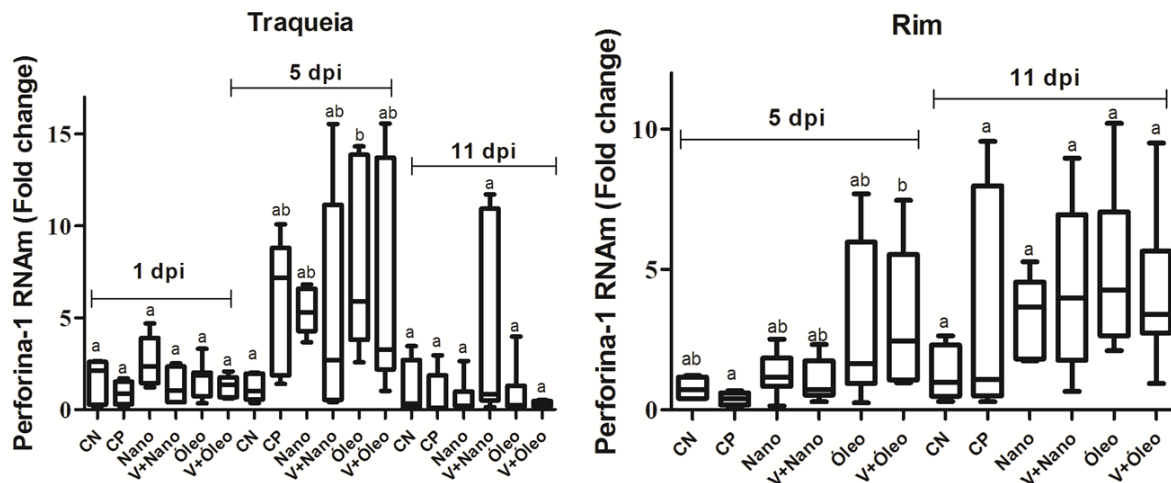


Figura 11. Expressão do gene da Perforina-1 (mensurado como média do número de vezes de alteração – “fold changes” em relação ao CN) nas amostras de traqueia e rim das aves do controle negativo (CN), controle positivo (CP), vacinadas com VBI-CS (Nano), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-CS (V+Nano), vacinadas com VBI-O (Óleo), vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-O (V+Óleo). As diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn’s estão representadas por letras diferentes entre os grupos ($P \leq 0,05$).

6.5.5 Mensuração de anticorpos na mucosa contra o VBI

Os níveis de anticorpos anti-VBI do isótipo IgA presentes na mucosa no pré-desafio e pós-desafio com VBI foram avaliados e estão apresentados na Figura 12. No pré-desafio, os níveis de IgA estavam maiores nos grupos Óleo e V+Nano do que no grupo V+Óleo ($P \leq 0,05$). Já com 1 dpi, o nível de anticorpos IgA na mucosa dos animais do grupo Nano aumentou mais precocemente e apresentou diferença significativa em relação aos grupos CP e V+Óleo ($P \leq 0,05$). Além disso, verifica-se

que o nível de anticorpos anti-VBI do isótipo IgA continuou aumentando nos animais do grupo Nano no 5º dpi, e foi maior do que os níveis de IgA dos animais dos grupos CN, CP, Óleo e V+Óleo ($P \leq 0,05$). No 11º dpi, o nível de anticorpos IgA permaneceu alto na mucosa das aves do grupo Nano. Entretanto, esses anticorpos também aumentaram na mucosa dos animais dos grupos CP, V+Nano e Óleo, sendo que todos esses grupos apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo CN ($P \leq 0,05$).

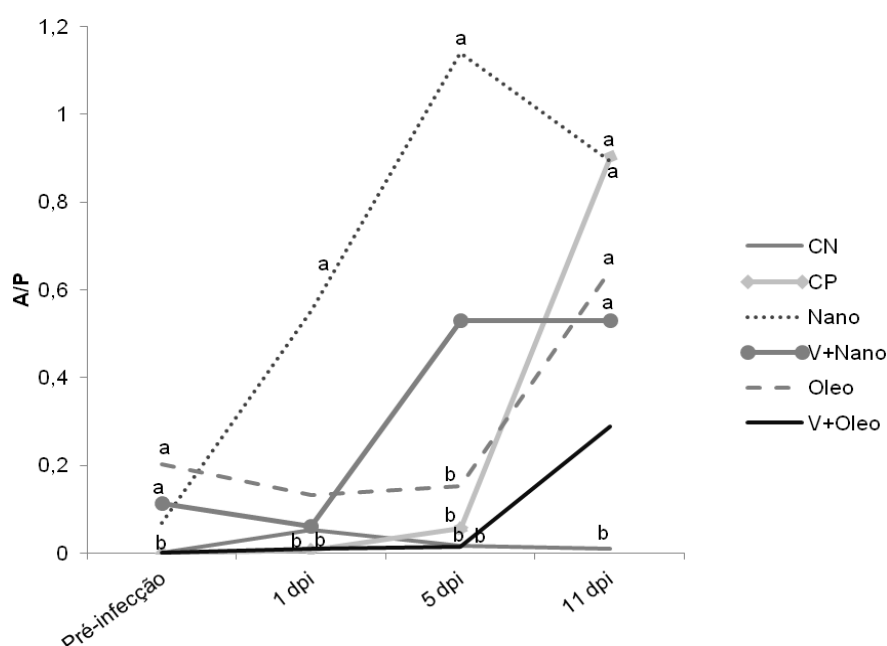


Figura 12. Média dos níveis de anticorpos anti-VBI do isótipo IgA (mensurado como valores médios A/P) na mucosa das aves dos grupos controles e vacinados no período que antecede o desafio e nos intervalos de 1, 5 e 11 dpi. As diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn's estão representadas com letras diferentes ($P \leq 0,05$). CN: aves do controle negativo; CP: aves do grupo controle positivo; Nano: aves vacinadas com VBI-CS; V+Nano: aves vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-CS; Óleo: aves vacinadas com VBI-O; V+Óleo: aves vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-O.

Os níveis de anticorpos anti-VBI do isótipo IgG na mucosa no pré-desafio e em três intervalos pós-infecção foram avaliados e os resultados se encontram na

Figura 13. Um dia antes do desafio, os níveis de IgG anti-VBI na mucosa das aves dos grupos V+Nano e V+Óleo estavam altos e apresentaram diferenças significativas em relação aos grupos CN, CP e Óleo ($P \leq 0,05$). Além disso, os títulos de IgG anti-VBI na mucosa dos animais do grupo Nano estavam maiores do que nos animais do grupo CN ($P \leq 0,05$). No 1º dpi, o nível de IgG anti-VBI na mucosa dos animais do grupo V+Nano permaneceu elevado e apresentou diferença significativa em relação aos grupos CN, CP e Óleo. Ademais, o grupo V+Óleo também apresentou diferença quando comparado ao grupo CN ($P \leq 0,05$). No 5º dpi, os níveis de IgG continuaram superiores nos grupos V+Nano e V+Óleo quando comparados aos grupos CN, CP e Óleo ($P \leq 0,05$). Além disso, o grupo Nano apresentou também no 5º dpi, diferença significativa em relação ao grupo CN ($P \leq 0,05$). Os níveis de anticorpos IgG anti-VBI foram maiores, no intervalo de 11 dpi, nos grupos V+Nano e V+Óleo comparados aos grupos CN e Nano ($P \leq 0,05$).

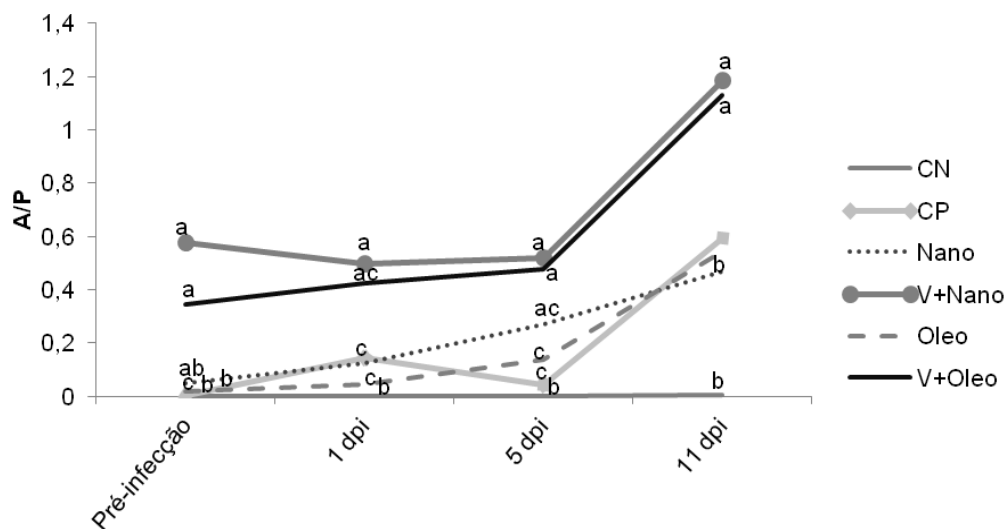


Figura 13. Média dos níveis de anticorpos anti-VBI do isótipo IgG (mensurados como valores médios A/P) na mucosa de aves dos grupos controles e vacinados no período que antecede o desafio e nos intervalos de 1, 5 e 11 dpi. As diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn's estão representadas com letras diferentes ($P \leq 0,05$). CN: aves do controle negativo; CP: aves do grupo controle positivo; Nano: aves vacinadas com VBI-CS; V+Nano: aves vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da

vacinação com VBI-CS; Óleo: aves vacinadas com VBI-O; V+Óleo: aves vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-O.

6.5.6 Mensuração de anticorpos sistêmico contra o VBI

Os níveis de anticorpos anti-VBI do isótipo IgM no compartimento sistêmico e no período que antecede o desafio e nos três intervalos pós-infecção estão demonstrados na Figura 14. Observa-se que, no período que antecede o desafio, o nível de IgM no compartimento sistêmico das aves do grupo V+Nano estava elevado quando comparado aos demais grupos ($P \leq 0,05$). No 1º dpi, não houve diferença significativa para os níveis de IgM entre os grupos experimentais testados ($P \geq 0,05$). No intervalo do 5º dpi, os grupos CP e Óleo apresentaram maiores níveis de IgM do que os grupos CN e V+Óleo ($P \leq 0,05$). Já, no 11º dpi, foram encontradas diferenças significativas entre os grupos Nano e V+Nano em relação ao grupo CN ($P \leq 0,05$).

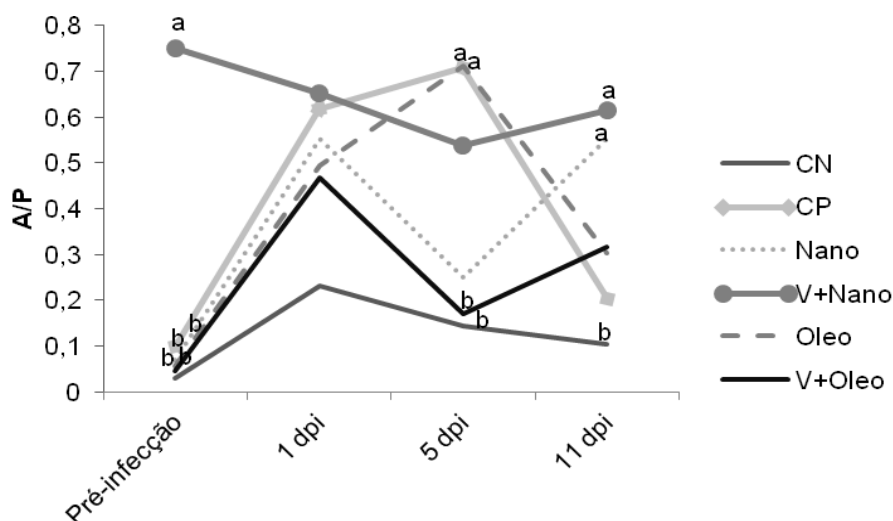


Figura 14. Média dos níveis de anticorpos anti-VBI do isótipo IgM (mensurados como valores médios A/P) no compartimento sistêmico das aves dos grupos controles e vacinados no período que antecede o desafio e nos intervalos de 1, 5 e 11 dpi. As diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn's estão representadas com letras diferentes ($P \leq 0,05$). CN: aves do controle negativo; CP: aves do grupo controle positivo; Nano: aves vacinadas com VBI-CS; V+Nano: aves vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-CS; Óleo: aves vacinadas com VBI-O; V+Óleo: aves vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-O.

Os níveis de anticorpos anti-VBI do isótipo IgG no compartimento sistêmico e correspondentes ao período que antecede o desafio e nos três intervalos pós-infecção foram avaliados e são mostrados na Figura 15. Foram encontrados níveis elevados de anticorpos IgG sistêmicos, no período pré-desafio das aves dos grupos V+Nano e V+Óleo, quando comparados aos grupos CN, CP, Nano e Óleo ($P \leq 0,05$). Já, no intervalo de 1 dpi, os níveis de IgG anti-VBI dos grupos que receberam duas doses de vacinas permaneceram elevados, apresentando diferenças significativas em relação aos grupos CN e CP ($P \leq 0,05$). Além disso, o grupo V+Óleo apresentou um maior nível de anticorpos IgG anti-VBI na comparação com o grupo que recebeu apenas uma dose da vacina oleosa (grupo Óleo) ($P \leq 0,05$). Os níveis de anticorpos IgG permaneceram elevados no 5º dpi para as aves dos grupos V+Nano e V+Óleo e apresentaram valores de médias significativamente maiores do que os dos grupos CN e CP ($P \leq 0,05$). Além disso, o grupo V+Óleo apresentou diferença significativa nos níveis de anticorpos IgG em relação ao grupo Nano ($P \leq 0,05$). No intervalo de 11 dpi, houve um aumento nos níveis de IgG para as aves dos grupos V+Nano e V+Óleo, alcançando valores médios superiores aos grupos CN e Nano ($P \leq 0,05$). Os níveis de IgG anti-VBI também aumentaram nas aves do grupo imunizado apenas com uma dose da vacina oleosa (Óleo), que apresentou diferença significativa em relação ao grupo CN ($P \leq 0,05$).

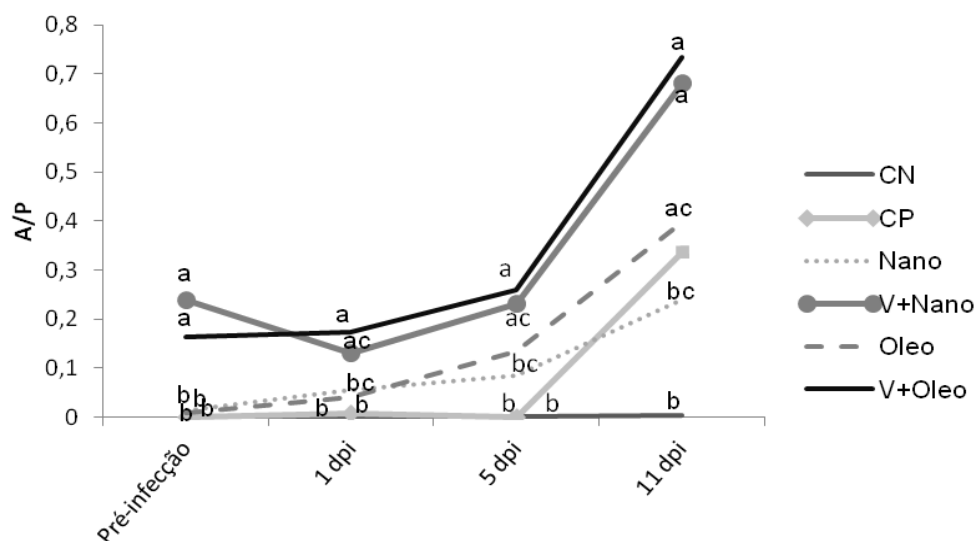


Figura 15. Média dos níveis de anticorpos anti-VBI do isótipo IgG (mensurado como valores médios A/P) no compartimento sistêmico das aves dos grupos controles e vacinados no período que antecede o desafio e nos intervalos de 1, 5 e 11 dpi. As diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn's estão representadas com letras diferentes ($P \leq 0,05$). CN: aves do controle negativo; CP: aves do grupo controle positivo; Nano: aves vacinadas com VBI-CS; V+Nano: aves vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com VBI-CS; Óleo: aves vacinadas com uma vacina contendo adjuvante oleoso; V+Óleo: aves vacinadas com uma vacina viva atenuada seguida da vacinação com a vacina contendo adjuvante oleoso.

6.6 Correlação entre parâmetros das respostas imunes contra o VBI e as alterações patológicas induzidas por esse vírus

As correlações foram determinadas e analisadas separadamente para os grupos que receberam a vacina VBI-CS daqueles que receberam a vacina VBI-O. De uma forma geral, os grupos que receberam a vacina VBI-CS apresentaram um maior número de correlações negativas significativas entre as alterações patológicas na traqueia e rim com as respostas imunes humoral e celular (5 dpi) de aves vacinadas (Tabelas 5 e 6).

Os escores de ciliostase traqueal dos grupos que receberam a vacina VBI-CS apresentaram correlações negativas significativas com os níveis de anticorpos anti-

VBI do isótipo IgG nos compartimentos da mucosa e sistêmico e anticorpos do isótipo IgA na mucosa. Por outro lado, os grupos que receberam a vacina oleosa VBI-O apresentaram correlações negativas significativas das alterações patológicas (ciliostase) com os níveis de anticorpos locais e sistêmicos do isótipo IgG anti-VBI.

Quanto aos resultados de carga viral na traqueia das aves dos grupos Nano e V+Nano, foram detectadas correlações negativas no 5º e 11º dpi com os níveis de anticorpos anti-VBI dos isótipos IgA e IgG (locais). Foram também encontradas correlações negativas entre a carga viral na traqueia e no rim no 11º dpi com os níveis de anticorpos anti-VBI do isótipo IgG (sistêmico). Já as aves que foram imunizadas com vacina contendo adjuvante oleoso (VBI-O), apresentaram correlações negativas da carga viral na traqueia no 11º dpi com os níveis de anticorpos IgG anti-VBI locais e sistêmicos. Além disso, foram observadas correlações negativas da carga viral na traqueia no 5º dpi com os níveis de anticorpos IgG anti-VBi locais, e no rim no 5º dpi com os níveis de anticorpos IgG sistêmico.

As aves imunizadas com nanopartículas de quitosana apresentaram, ainda, correlações negativas significativas entre os níveis de expressão da Granzima A com o escore de ciliostase e com as cargas virais na traqueia (5º e 11º dpi) e no rim (11º dpi).

Tabela 6. Correlação das respostas imunes humoral e celular com a ciliostase traqueal e com as cargas virais detectadas na traqueia e nos rins dos grupos vacinados com VBI-CS.

	IgA	IgG (M)	IgG (S)	IgM	CD8 ⁺	Granz.	Perf.	IFN γ
Ciliostase 5 dpi	-0,573*	-0,809*	-0,723*	-	-0,383	-0,482*	-0,297	-0,385
Carga viral 5 dpi (T)	-0,499*	-0,522*	-0,366	-	-0,323	-0,553*	-0,147	-0,244
Carga viral 11 dpi (T)	-0,413*	-0,338	-0,487*	-0,251	-0,245	-0,551*	-	-0,098
Carga viral 5 dpi (R)	-	-	-0,533*	-	-	-	-0,508	-
Carga viral 11 dpi (R)	-	-	-0,181	-0,215	-	-0,517*	-	-

Dpi: dias pós infecção; T: Traqueia; R:Rim; ; M: mucosa; S: soro; Granz.: Granzima A; Perf.: Perforina.

* (asterisco) representa diferença significativa pelo Teste de correlação de Spearman com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 7. Correlação das respostas imunes humoral e celular com a ciliostase traqueal e com as cargas virais detectadas na traqueia e nos rins dos grupos vacinados com VBI-O.

	IgA	IgG (M)	IgG (S)	IgM	CD8 ⁺	Granz.	Perf.	IFN γ
Ciliostase 5 dpi	-0,044	-0,683*	-0,646*	-	-	-	-	-
Carga viral 5 dpi (T)	-	-0,457*	-0,148	-	-0,058	-	-	-0,010
Carga viral 11 dpi (T)	-	-0,619*	-0,419*	-	-	-	-	-
Carga viral 5 dpi (R)	-	-	-0,438*	-	-	-0,122	-0,339	-
Carga viral 11 dpi (R)	-	-	-0,018	-0,129	-	-0,310	-0,024	-

Dpi: dias pós infecção; T: Traqueia; R:Rim; ; M: mucosa; S: soro; Granz.: Grazima A; Perf.: Perforina.

* (asterisco) representa diferença significativa pelo Teste de correlação de Spearman com intervalo de confiança de 95%.

7. DISCUSSÃO

As preparações de nanopartículas de quitosana têm se constituído em uma alternativa interessante e com grande potencial para a produção de vacinas mais eficientes destinadas à administração por via mucosa em aves (KAIKABO; ABDULKARIM; ABAS, 2017; ZHAO et al., 2012), uma vez que elas conciliam dois atributos muito desejáveis, tais como um sistema eficiente de entrega de antígenos para as células apresentadoras de antígenos e as células imunocompetentes (linfócitos T e B) e forte atividade imunoestimulante (ESMAEILI et al., 2010; NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2010; O'HAGAN; SINGH, 2003; SINGH; O'HAGAN, 2003). Deve-se destacar também, neste caso, que há um grande interesse na vacinação por via das mucosas, haja visto que a maioria dos patógenos infecta os organismos hospedeiros por esta via, assim como ocorre com o VBI. Dessa forma, foi desenvolvido no presente estudo uma vacina inativada contendo uma variante brasileira do VBI inativada e encapsulada em nanopartículas de quitosana (VBI-CS), para ser administrada por via óculo-nasal em aves. Além disso, foi avaliada a eficácia dessa preparação vacinal por meio de desafio com a estirpe homóloga virulenta e comparada com a formulação convencional de vacina inativada com esse mesmo vírus e acrescida de adjuvante oleoso para ser administrada por via parenteral.

Para desenvolver uma eficiente vacina de uso por via das mucosas utilizando nanopartículas, é necessário que tal vacina apresente características essenciais quanto à capacidade de ativação e direcionamento das respostas imunes. E, nesse sentido, parâmetros como tamanho, carga da superfície e forma dessas nanopartículas são fatores críticos para o sucesso desse tipo de preparação de carreador-adjuvante vacinal (AMIDI et al., 2010; KOPPOLU; ZAHAROFF, 2013). Assim, optou-se no presente trabalho por utilizar o método de gelificação ionotrópica para formular as nanopartículas de quitosana, o qual baseia-se em um mecanismo de interação não covalente, entre os grupos de aminas positivas da quitosana com um material aniônico, como são as proteínas negativamente carregadas do VBI, sendo que esse conjunto também se associa com íons carregados negativamente

do TPP (AMIDI et al., 2010; CSABA; GARCIA-FUENTES; ALONSO, 2009; LIU; GAO, 2009; ZHAO et al., 2012). A vantagem desta metodologia para o preparo de nanopartículas de quitosana é que ela não utiliza solventes orgânicos, calor ou agitação vigorosa, os quais podem danificar ou desnaturar proteínas mais lábeis presentes na composição antigênica do VBI (MOHAMMADPOUR DOUNIGHI et al., 2012; SAWAENGSAK et al., 2014). Além disso, trata-se de uma técnica de fácil processamento e mais barata, porque não necessita de reagentes mais onerosos ou equipamentos mais sofisticados para a sua formulação.

O método de gelificação ionotrópica é pH-responsivo, interferindo nos resultados de tamanho, PDI, zeta potencial, forma e eficiência de encapsulamento (GAN et al., 2005; LIU; GAO, 2009; MATTU; LI; CIARDELLI, 2013). Assim, foi observado no presente estudo que o pH 4,5 da solução de quitosana para a formulação da vacina VBI-CS resultou em uma melhor eficiência de encapsulamento, bem como em um tamanho mais apropriado para interação com células do sistema imune e ainda em um menor PDI, sem que fosse provocada a agregação das nanopartículas. Deve-se considerar que o pH é um fator determinante na preparação de nanopartículas de quitosana, pois quando o pH da solução de quitosana está acima de seu valor crítico, ocorre uma desprotonação da quitosana, interferindo no procedimento de reticulação (entrecruzamento) com os íons do TPP ou até mesmo com as proteínas virais (FAN et al., 2012; GAN et al., 2005; LIU; GAO, 2009; MATTU; LI; CIARDELLI, 2013).

Com relação às variáveis e fatores influenciados durante a preparação de nanopartículas e que são eficientes como carreador-adjuvante, verificou-se que alguns estudos relataram que o tamanho, a carga da superfície e a forma das nanopartículas desempenham importantes papéis no reconhecimento do antígeno pelas APC's (GREGORY; TITBALL; WILLIAMSON, 2013; MANOLOVA et al., 2008; OYEWUMI; KUMAR; CUI, 2010; ZHAO et al., 2014b). Dessa forma, é importante destacar que as nanopartículas de quitosana contendo o VBI que foram preparadas nesse estudo apresentaram um tamanho de 286 nm, um potencial zeta positivo e forma esférica (AKAGI; BABA; AKASHI, 2012; ZHAO et al., 2014b). A propósito, sabe-se que partículas catiônicas menores que 500 nm como carreadores de antígenos vacinais revelam-se mais eficientes para o reconhecimento pelas APCs,

principalmente as células dendríticas (DC's) (AKAGI; BABA; AKASHI, 2012), enquanto que partículas esféricas são mais facilmente internalizadas pelas células, como linfócitos B, tornando-se mais eficientes na indução e produção de anticorpos (MOON; HUANG; IRVINE, 2012; ZHAO et al., 2014b). Salienta-se então, que as nanopartículas de quitosana preparadas no presente trabalho atendem a essas características positivas mencionadas, o que provavelmente explica o seu bom desempenho como carreador-adjuvante na vacina experimental contra o VBI.

Além disso, a vacina VBI-CS apresentou potencial zeta de +19,9 mV, o que a caracteriza como uma partícula estável em suspensão. Deve-se também considerar nesse ponto, que o potencial zeta, também está relacionado com a estabilidade da dispersão coloidal. De forma geral, suspensões coloidais com alto potencial zeta (negativo ou positivo) são eletricamente estáveis enquanto coloides com baixo potencial zeta (próximo de 0) podem coagular, aglomerar ou flocular, e isso comprometeria a atividade carreadora-adjuvante de nanopartículas usadas na composição vacinal (ZHAO et al., 2012).

As nanopartículas de quitosana são capazes de encapsular uma grande quantidade de agentes biológicos ou antígenos vacinais (DZUNG et al., 2011; EL NAGGAR; MADKOUR; HUSSEIN, 2017; KAIKABO; ABDULKARIM; ABAS, 2017; VOLKOVA et al., 2014; ZHANG et al., 2010b; ZHAO et al., 2012). Neste estudo, a formulação utilizada para preparar as nanopartículas de quitosana com o VBI (VBI-CS) apresentou uma eficiência de encapsulamento viral de 85%. Assim, pode-se considerar que a maior parte dos antígenos presentes na suspensão viral usada foi encapsulada, provavelmente devido a vantagem desse biopolímero interagir com as proteínas de cargas negativas presentes no VBI, o que resultou em um encapsulamento eficiente.

A quitosana apresenta ainda uma característica biológica importante que é a baixa citotoxicidade (AMIDI et al., 2010; SMITH; SIMON; BAKER, 2013; ZHAO et al., 2012) e isso foi confirmado mais uma vez no nosso estudo, através do teste de citotoxicidade celular, além de a vacina com quitosana não provocar nenhuma manifestação clínica local após a sua administração via óculo-nasal nas aves.

Em nosso estudo, a vacina formulada com nanopartículas de quitosana contendo a estirpe variante IBV/Brazil/PR05 do genótipo BR-I do VBI (VBI-CS) foi

comparada com uma vacina convencional utilizando o adjuvante oleoso Montanide ISA 71 acrescido da mesma estirpe viral (VBI-O) inativada, exceto que essa última preparação vacinal foi administrada por via intramuscular. As aves foram separadas em grupos experimentais que receberam diferentes esquemas de vacinação, utilizando ou não previamente uma vacina viva atenuada comercial contendo a estirpe heteróloga do genótipo Massachusetts do VBI. Os resultados demonstraram que os quatro protocolos vacinais utilizados apresentaram cinéticas de respostas imunes humoral e celular diferentes. Além disso, foi observado que as aves dos grupos imunizados somente com nanopartículas de quitosana (grupo Nano) ou com a associação de uma primeira vacinação com a estirpe H120 seguida da vacinação com nanopartículas de quitosana (grupo V+Nano) apresentaram um nível de proteção similar contra o desafio com a estirpe homóloga, conforme os resultados da ciliostase traqueal, carga viral e histopatologia da traqueia e dos rins observados nesse estudo. Aves do grupo imunizadas pela combinação de vacina viva atenuada (estirpe H120) seguida da vacina inativada oleosa (grupo V+Óleo) também apresentaram proteção contra o desafio, porém as aves que receberam apenas uma única dose da vacina incorporada ao adjuvante oleoso não demonstraram grau suficiente de proteção contra o desafio e foram consideradas não protegidas por essa preparação e esquema vacinal utilizado.

Com respeito a esses resultados diferentes e aparentemente conflitantes de nosso estudo que foram observados após o uso das vacinas inativadas com essas duas preparações de adjuvantes (nanopartículas de quitosana ou adjuvante oleoso Montanide ISA 71) ou ainda de diferentes esquemas vacinais, combinando ou não a administração de vacina viva atenuada heteróloga, deve-se considerar que muitos fatores podem influenciar o tipo e a intensidade das respostas imunes induzidas contra um patógeno viral, como a estratégia vacinal e o tipo de vacina usada (agente viral vivo atenuado ou inativado), as células envolvidas no reconhecimento do antígeno, a idade de vacinação das aves, o tipo de adjuvante e a via de administração usada para a vacinação (CSABA; GARCIA-FUENTES; ALONSO, 2009; GREGORY; TITBALL; WILLIAMSON, 2013; OYEWUMI; KUMAR; CUI, 2010; ZHAO et al., 2012, 2016).

O grupo de aves imunizado apenas com a vacina de nanopartículas de quitosana contendo o VBI induziu mais precocemente maiores níveis de anticorpos anti-VBI do isótipo IgA no compartimento de mucosa logo após o desafio e maiores níveis de expressão de genes de RIC de memória, que foram detectados nesse estudo pelo aumento de expressão dos genes CD8 β , Granzima A e IFN γ na traqueia no intervalo de 1 dpi. Ao contrário disso, as aves imunizadas pela combinação de vacina viva (estirpe H120) com vacina a vacina VBI-CS (V+Nano) induziu após o desafio uma mais forte resposta de anticorpos anti-VBI do isótipo IgG em ambos compartimentos (mucosa e sistêmico) e do isótipo IgM, e também maiores níveis de expressão de genes de RIC caracterizada nesse caso pelo aumento da expressão dos genes CD8 β , Granzima A e IFN γ na traqueia no 5^o dpi e do gene CD8⁺ no rim no 11^o dpi.

Por outro lado, quando se avalia o grupo de aves imunizadas com a vacina viva atenuada e a vacina VBI-O (V+Óleo), verifica-se que esse esquema vacinal induziu respostas predominantes por anticorpos do isótipo IgG, tanto nos compartimentos de mucosa como sistêmico e também uma maior expressão do gene Granzima A na traqueia e de Perforina no rim, no 5^o dpi. Já, no grupo imunizado apenas com vacina oleosa (Óleo) houve indução apenas de uma expressão aumentada do gene da Perforina na traqueia no intervalo de 5 dpi, porém pouca ou nenhuma alteração nos níveis de nenhum dos isótipos de anticorpos anti-VBI nos compartimentos sistêmico ou de mucosa.

Em muitos estudos, a indução de resposta imune, principalmente no compartimento de mucosa, tem sido melhorada quando o antígeno é encapsulado em partículas de quitosana (ESMAEILI et al., 2010; ILLUM et al., 2001; VAN DER LUBBEN et al., 2001), tal como foi observado em nosso estudo. Nanopartículas de quitosana apresentam certa habilidade de aumentar ambas as respostas imunes, celular e humoral, e também balancear as respostas Th1/Th2, principalmente em mucosa (BORCHARD; ESMAEILI; HEUKING, 2012; SAWAENGSACK et al., 2014; WEN et al., 2011; ZHAO et al., 2012).

Deve-se salientar também, que o nosso estudo é pioneiro no desenvolvimento de uma vacina inativada contendo partículas do VBI encapsuladas em nanopartículas de quitosana e reforça mais uma vez, que assim como outros

trabalhos que utilizaram o mesmo modelo vacinal, porém com outros antígenos e/ou patógenos, foi capaz de induzir de forma efetiva respostas imunes mediadas por anticorpos e por células T no local primário de replicação do VBI. E, tais respostas imunes conferiram assim, um estado efetivo de proteção às aves contra o desafio com a estirpe homóloga nefropatogênica do VBI. Além disso, pode-se inferir do conjunto principal de nossos resultados, que uma eficiente resposta no local primário de replicação se constitui no principal mecanismo para impedir a estirpe patogênica do VBI de se replicar e provocar lesões em outros locais que ela apresenta tropismo, tal como ocorreu com a estirpe utilizada neste estudo em relação aos tecidos renais.

Uma vacina experimental contendo a hemaglutina (HA) do vírus da Influenza encapsulada em nanopartículas de quitosana foi desenvolvida e administrada por via intranasal em camundongos, na qual resultou na indução de uma forte resposta imune sistêmica (IgG) e de mucosa (IgA), assim como, em um maior número de células secretoras de IFN γ no baço. A vacina também conferiu proteção efetiva aos animais contra o desafio com uma estirpe letal do vírus da Influenza (SAWAENGSAK et al., 2014).

No mesmo contexto acima e para melhor compreender os bons resultados obtidos com a preparação da vacina VBI-CS, é importante considerar um estudo desenvolvido por Zhao et al. (2012), no qual foi preparada uma vacina experimental encapsulando uma estirpe vacinal viva atenuada lentogênica do VDN em nanopartículas de quitosana (VDN-CS-NPs) e a testada por via intranasal ou oral. Nesse estudo, os autores compararam a vacina VDN-CS-NPs com outras duas vacinas convencionais contra esse vírus; sendo uma vacina viva atenuada com a estirpe LaSota do VDN administrada por via nasal e com uma vacina inativada do VDN administrada por via intramuscular. Ao final desse experimento, os principais resultados obtidos demonstraram que a vacina VDN-CS-NPs induziu elevadas respostas imunes de mucosa e conferiu proteção total às aves contra o desafio com uma estirpe altamente virulenta do VDN, enquanto as vacinas LaSota viva atenuada e a inativada contra o VDN induziram proteção parcial contra o desafio por essa mesma estirpe virulenta do VDN.

Em outro estudo, Volkova et al. (2014) desenvolveram uma vacina inativada do VDN encapsulada em micropartículas de quitosana ou em nanopartículas de

fosfato de cálcio. Foi então verificado que três doses dessas vacinas em aves comerciais administradas por via mucosa (intranasal) resultou na indução de altos títulos de anticorpos sistêmicos e de mucosa quando comparadas ao antígeno viral administrado sozinho. Além disso, quando esses autores compararam as duas vacinas encapsuladas, eles observaram que a vacina de quitosana induziu melhor proteção nas aves contra o desafio com uma estirpe altamente virulenta do VDN do que a vacina de nanopartículas de fosfato de cálcio.

Ainda, as preparações de quitosana também já foram estudadas na composição de uma vacina de DNA administrada em aves SPF (ZHAO et al., 2014a). Neste estudo, a vacina de DNA contendo o gene F do VDN foi encapsulada em nanopartículas de quitosana e administrada por via intramuscular ou intranasal em aves. A vacina de DNA administrada por via intranasal induziu fortes respostas imunes de mucosa e sistêmica, principalmente levando a produção de altos níveis de anticorpos IgA, quando comparada com a mesma vacina administrada por via intramuscular ou apenas com a vacina de DNA não encapsulada em nanopartículas de quitosana.

Considerando-se os dados já obtidos na indução de resposta imune mais consistente e efetiva no compartimento de mucosa com o uso de nano ou micropartículas de quitosana como carreador – adjuvante de antígenos virais (vírus da influenza e VDN) em preparações vacinais, constata-se que os resultados do presente estudo ratificam esses atributos positivos desse carreador – adjuvante para uso em vacinas anti-virais a serem administradas por via de mucosas.

É fato que surtos com variantes e sorotipos do VBI estão ocorrendo no mundo todo (JACKWOOD, 2012) e nesse sentido a OIE recomenda identificar os genótipos mais prevalentes em cada região e usá-los estrategicamente como estirpe vacinal (BANDE et al., 2015, OIE, 2013). Entretanto, as vacinas desenvolvidas e comercializadas com uma estirpe de um genótipo específico do VBI para cada região, são, na maioria das vezes, constituídas por vacinas vivas atenuadas (JACKWOOD, 2012), implicando em maiores riscos quando utilizadas no campo, pela possibilidade de reversão de virulência, recombinação gênica com as variantes de campo do VBI, o que pode implicar no surgimento de novas estirpes e inclusive

sorotipos e patótipos desse vírus (BANDE et al., 2015; JACKWOOD, 2012; MO et al., 2013; ZHANG et al., 2010a).

Em nosso estudo, a preparação vacinal inativada VBI-CS comprovou ser uma vacina segura, por se tratar de um vírus inativado, formulada com uma estirpe do genótipo BR-I do VBI, que é um dos principais genótipos envolvidos com os surtos da BI no Brasil nos últimos anos (CHACÓN et al., 2011; FRAGA et al., 2013; VILLARREAL et al., 2010). Ademais, deve-se destacar que a preparação vacinal de nanopartículas de quitosana (VBI-CS) poderia ser expandida para outros modelos vacinais, utilizando outras estirpes de genótipos específicos do VBI presentes em cada região ou país. Além disso, pode-se também inferir que essa preparação vacinal constituída por nanopartículas de quitosana poderia ser utilizada para outros vírus aviários, por apresentar um conjunto relevante de vantagens, como fácil formulação, baixo custo, facilidade de administração (via mucosa) e eficiência na proteção contra um patógeno de mucosa, como o VBI.

Quando são comparados os protocolos vacinais testados nesse estudo, a vacina VBI-O associada a uma vacina viva atenuada (V+Óleo) induziu uma proteção ao desafio similar àquelas observadas nos grupos Nano e V+Nano. No entanto, sozinha, a vacina VBI-O foi incapaz de induzir fortes respostas imunes humoral e celular, tanto no compartimento sistêmico como das mucosas e também não conferiu proteção efetiva contra o desafio com a estirpe homóloga à que foi usada na composição da vacina.

O adjuvante oleoso Montanide ISA 71 utilizado na formulação da vacina VBI-O e tem sido cada vez mais utilizado em vacinas aviárias. Em um dos estudos, esse adjuvante foi comparado com nove diferentes adjuvantes na formulação de uma vacina inativada contra o vírus da Influenza aviária. E, dentre esses adjuvantes, cinco classes do adjuvante Montanide e ainda micropartículas de quitosana (LONE; SPACKMAN; KAPCZYNSKI, 2017). Os resultados deste estudo demonstraram que as classes de adjuvantes oleosos, incluindo Montanide ISA 71, foram capazes de induzir altos níveis de anticorpos sistêmicos e de proteger as aves contra o desafio. A vacina de micropartículas de quitosana foi usada por via subcutânea e induziu níveis inferiores de anticorpos quando comparada às vacinas com adjuvantes oleosos. Os autores sugerem que o uso da vacina de quitosana, quando

administrada por uma via sub-ótima, pode ter interferido no nível de resposta imune humoral. Entretanto, eles ressaltam que a vacina de quitosana induziu maiores níveis de anticorpos sistêmicos em aves que receberam essa vacina do que o grupo não vacinado, sendo que esses anticorpos foram eficientes para conferir proteção contra o desafio.

Além disso, é necessário mencionar que o adjuvante oleoso Montanide ISA 71 foi usado de forma bem sucedida em vacinas formuladas com proteínas recombinantes contra Eimeriose em aves (JANG et al., 2010, 2011, 2013). Na verdade, os autores desses estudos observaram que as vacinas contendo um antígeno da subunidade profilina da *Eimeria spp.* incorporadas ao Montanide ISA 71 estimularam a produção de altos níveis de anticorpos sistêmicos contra Eimeria e ativaram a RIC do tipo T CD8⁺, além de terem proporcionado uma diminuição acentuada na quantidade de oocistos pós-desafio (JANG et al., 2010, 2011). Entretanto, em relação ao nosso estudo, verifica-se que a resposta imune cito-mediada mensurada por meio da expressão dos genes CD8 β , Granzima A e IFN γ em aves que receberam apenas a vacina VBI-O foi inferior às respostas das aves que receberam uma dose da vacina de nanopartículas de quitosana com o VBI (VBI-CS).

O protocolo vacinal utilizado por SANTOS (2015), no qual foi usada uma vacina viva atenuada comercial com a estirpe H120 seguida pela aplicação da vacina formulada com a estirpe do genótipo IBV/Brazil/PR05 incorporada ao adjuvante oleoso Montanide ISA 71 resultou em aumentos significativos nos níveis de anticorpos anti-VBI do isótipo IgG tanto na secreção lacrimal como no soro sanguíneo e também em elevações na expressão dos genes relacionados às respostas imunes cito-mediadas, sobretudo CD8 β e Granzima A, quando comparado ao grupo desafiado e não vacinado. Tais perfis de respostas imunes foram também observados em nosso estudo, no qual também foram usadas duas doses de vacinas (1^a dose – vacina viva atenuada com a estirpe H120 e a 2^a dose vacina oleosa com Montanide ISA 71 com estirpe do genótipo BR-I do VBI (grupo de aves - VBI-O).

Entretanto, e diferentemente dos dados de Santos (2015), foi observado em nosso estudo que ambos os protocolos vacinais utilizando VBI-O induziram aumento na expressão do gene da Perforina na traqueia e no rim das aves, sendo que esse

gene não alterou significativamente a sua expressão em aves que receberam a vacina de nanopartículas de quitosana (VBI-CS), associada ou não a vacina viva atenuada heteróloga (estirpe H120 do VBI). Nesse sentido, é necessário destacar que o gene da Perforina codifica uma proteína com atividade enzimática e que é secretada pelas células citotóxicas, como células T CD8+, T $\gamma\delta$ e células “natural killer” (NK), para agir na abertura de poros em células infectadas, facilitando a entrada de granzimas e outras proteases indutoras de apoptose nas células alvos infectadas por um vírus (PIPKIN; LIEBERMAN, 2007).

A perforina pode então ser utilizada para mensurar a atividade citotóxica após exposição a antígenos virais. No entanto, deve-se considerar que a ação da Perforina é complementada por outros mediadores da resposta imune citotóxica, principalmente a Granzima homólogo A e o IFN γ , que quando agem em conjunto, controlam de forma mais efetiva a infecção pelo VBI (GURJAR; GULLEY; VAN GINKEL, 2013; OKINO et al., 2013). Assim, nossa hipótese é a de que a expressão do gene da perforina, nas condições de nosso estudo, parece ser menos crítica para conferir proteção contra o desafio pelo VBI, do que as expressões aumentadas dos genes CD8 β , Granzima homólogo A e IFN γ , que foram registradas para as aves dos grupos vacinadas com nanopartículas de quitosana associadas ou não a vacinas vivas atenuadas heterólogas ou imunizadas com vacinas com adjuvante oleoso, associadas a vacinas vivas atenuadas (Nano, V+Nano e V+Óleo), e que induziram um estado efetivo de proteção contra o desafio comparados aos grupos CP e Óleo.

Os resultados de correlação entre as alterações patológicas (ciliostase traqueal e cargas virais na traqueia e nos rins) pós-desafio com a estirpe virulenta e homóloga do VBI e as respostas imunes humoral e celular induzidas pelas diferentes preparações vacinais testadas demonstram claramente que as aves que receberam a vacina VBI-CS apresentaram significantes correlações negativas entre tais alterações patológicas e ambos os tipos de respostas imunes.

Essas correlações negativas entre alterações patológicas causadas pelo VBI e respostas imunes induzidas por vacinas já foram descritas anteriormente por outros autores em aves infectadas e/ou vacinadas ou não por esse vírus (OKINO et al., 2013; SEO; COLLISSON, 1997). A ativação e indução de células e mediadores da RIC no início da infecção apresenta uma diminuição das lesões patológicas e

sinais clínicos da BI (CHHABRA; CHANTREY; GANAPATHY, 2015), demonstrando que a memória imunológica celular é importante para a eliminação do vírus do ambiente interno do organismo hospedeiro após o desafio (CHHABRA et al., 2015; OKINO et al., 2013).

Quanto à resposta imune humoral, verifica-se que as aves que receberam a vacina VBI-CS revelaram acentuadas correlações negativas das alterações patológicas pós-desafio na traqueia e nos rins com os níveis de anticorpos anti-VBI dos isótipos IgA e IgG, tanto produzidos local como sistemicamente, enquanto os grupos vacinados com VBI-O apresentaram correlação negativa dessas alterações patológicas com os anticorpos anti-VBI do isótipo IgG (mucosa e sistêmico). Nesse contexto, foi demonstrado que os anticorpos anti-VBI lacrimais apresentam uma boa correlação com o estado de proteção ao desafio, ou indicam que uma imunização efetiva foi induzida pelas vacinações (OKINO et al., 2013).

Sendo assim, pode-se inferir que uma proteção imune eficaz contra a infecção por VBI depende de anticorpos locais e mecanismos imunes celulares, e que ambos os tipos de mediadores de respostas imunes adaptativas devem idealmente ser ativados pelas vacinas utilizadas e estar atuando de forma adicional ou sinérgica, a fim de conferir um estado de proteção mais completo e efetivo contra a infecção pelo VBI (BANDE et al., 2015; CHHABRA et al., 2015; OKINO et al., 2013), tal como foi demonstrado em nosso estudo nas aves que receberam a vacina VBI-CS associada ou não ao uso anterior de vacina viva atenuada heteróloga do VBI.

8. CONCLUSÕES

- ✓ As nanopartículas de quitosana utilizadas para encapsular as partículas inativadas de uma estirpe do genótipo brasileiro do VBI comprovaram ser um bom carreador e adjuvante de mucosa na preparação vacinal que foi formulada (VBI-CS).
- ✓ O método de gelificação ionotrópica utilizado nesse estudo para a formulação de nanopartículas de quitosana com o VBI (VBI-CS) resultou em uma eficiência de encapsulamento de 85% das partículas virais e em nanopartículas catiônicas com tamanho de 286 nm, formato esférico e não tóxica para as aves.
- ✓ A vacina VBI-CS administrada por via óculo-nasal em aves SPF induziu respostas imunes humorais e celulares efetoras contra o desafio com a estirpe virulenta homóloga do VBI, quando utilizada sozinha ou associada a uma vacina viva atenuada com a estirpe heteróloga H120.
- ✓ Uma única dose da vacina VBI-CS administrada por via óculo-nasal promoveu uma resposta imune humoral mais forte no compartimento das mucosas, levando principalmente a um aumento mais precoce nos níveis de IgA anti-VBI e a uma efetiva RIC de memória, caracterizada pela mais elevada expressão dos genes CD8 β , Granzima A e INF γ local.
- ✓ A combinação de uma primeira dose da vacina viva atenuada H120 seguida da vacinação com VBI-CS induziu uma marcante produção de anticorpos IgG anti-VBI sistêmico e de mucosa, e também elevados níveis na expressão dos genes CD8 β , Granzima A e INF γ , principalmente no compartimento das mucosas.
- ✓ A vacina contendo a estirpe do genótipo brasileiro do VBI inativada e incorporada ao adjuvante oleoso Montanide ISA 71 (VBI-O) que foi administrada por via intramuscular, não induziu, sozinha, proteção eficiente contra o desafio com a estirpe homóloga e virulenta do VBI, resultando em lesões mais acentuadas, tanto no trato respiratório como nos rins.
- ✓ A combinação de uma primeira dose da vacina viva atenuada com a estirpe H120 seguida da vacinação com vacina oleosa (VBI-O) induziu proteção similar à daquelas aves que receberam a vacina VBI-CS, induzindo maiores níveis de anticorpos IgG anti-VBI nos compartimentos da mucosa e sistêmico, e também em

maiores níveis de expressão dos genes da Granzima A na traqueia e de Perforina no rim.

✓ A vacina VBI-CS induziu respostas imunes humoral e cito-mediada com maiores correlações negativas com as intensidades das alterações patológicas na traqueia e rim, demonstrando dessa maneira que o uso dessa vacina foi capaz de induzir respostas imunes capazes de conferir as aves imunizadas um estado de proteção mais efetivo contra a infecção pelo VBI.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J.T.; MOURÃO, M.M.; SANTOS, C.E.; VELOSO, C.J.M.; RESENDE, J.S.; FLATSCHART, R.B.; FOLGUERAS-FLATSCHART, A.V.; JÚNIOR, S.N.; SANTORO, M.M.; MENDES, A.C.R.; FRANCO, G.R.; SILVA, A.; CAMPOS, A.B.; FERNANDEZ, S. Molecular Studies of the Brazilian Infectious Bronchitis Virus Isolates. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 12, n. 2, p. 107–110, 2010.

ACEVEDO, A.M.; DÍAZ DE ARCE, H.; BRANDÃO, P.E.; COLAS, M.; OLIVEIRA, S.; PÉREZ, L.J. First evidence of the emergence of novel putative infectious bronchitis virus genotypes in Cuba. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 2, p. 1046–1049, 2012.

AKAGI, T.; BABA, M.; AKASHI, M. Biodegradable nanoparticles as vaccine adjuvants and delivery systems: Regulation of immune responses by nanoparticle-based vaccine. **Advances in Polymer Science**, v. 247, p. 31–64, 2012.

ALEXANDER, D. J.; GOUGH, R. E. Isolation of avian infectious bronchitis virus from experimentally infected chickens. **Research in veterinary science**, v. 23, n. 3, p. 344–347, 1977.

AMIDI, M.; MASTROBATTISTA, E.; JISKOOT, W.; HENNINK, W.E. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 59–82, 2010.

ARCA, H. Ç.; GÜNBEYAZ, M.; ŞENEL, S. Chitosan-based systems for the delivery of vaccine antigens. **Expert Review of Vaccines**, v. 8, n. 7, p. 937–953, 2009.

ARIAANS, M. P.; VAN DE HAAR, P.M.; HENSEN, E.J.; VERVELDE, L. Infectious Bronchitis Virus induces acute interferon-gamma production through polyclonal stimulation of chicken leukocytes. **Virology**, v. 385, n. 1, p. 68–73, 2009.

ARMESTO, M.; EVANS, S.; CAVANAGH, D.; ABU-MEDIAN, AB.; KEEP, S.; BRITTON, P. A recombinant Avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene belonging to the 4/91 serotype. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.

ASIF, M.; LOWENTHAL, J. W.; FORD, M. E.; SCHAT, K. A.; KIMPTON, W. G.; BEAN, A. G. Interleukin-6 expression after infectious bronchitis virus infection in chickens. **Viral immunology**, v. 20, n. 3, p. 479–86, 2007.

AUCOUTURIER, J.; DUPUIS, L.; GANNE, V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. **Vaccine**, v. 19, n. 17–19, p. 2666–2672, 2001.

BACON, A.; MAKIN, J.; SIZER, P. J.; JABBAL-GILL, I.; HINCHCLIFFE, M.; ILLUM, L.; CHATFIELD, S.; ROBERTS, M. Carbohydrate biopolymers enhance antibody responses to mucosally delivered vaccine antigens. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 10, p. 5764–5770, 2000.

BALESTRIN, E.; FRAGA, A. P.; IKUTA, N.; CANAL, C. W.; FONSECA, A. S.; LUNGE, V. R. Infectious bronchitis virus in different avian physiological systems--A field study in Brazilian poultry flocks. **Poultry Science**, v. 93, n. 8, p. 1922–1929, 2014.

BANDE, F.; ARSHAD, S. S.; BEJO, M. H.; MOEINI, H.; OMAR, A. R. Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, ID 424860, 2015.

BANDE, F.; ARSHAD, S. S.; OMAR, A. R.; BEJO, M. H.; ABUBAKAR, M. S.; ABBA, Y. Pathogenesis and Diagnostic Approaches of Avian Infectious Bronchitis. **Advance in Virology**, v. 2016, ID 4621659, 2016.

BAYRY, J.; GOUDAR, M. S.; NIGHOT, P. K.; KSHIRSAGAR, S. G.; LADMAN, B. S.; GELB JR., J.; GHALSASI, G. R.; KOLTE, G. N. Emergence of a nephropathogenic avian infectious bronchitis virus with a novel genotype in India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 916–918, 2005.

BENTO, D.; STAATS, H. F.; GONÇALVES, T.; BORGES, O. Development of a novel adjuvanted nasal vaccine: C48/80 associated with chitosan nanoparticles as a path to enhance mucosal immunity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 93, p. 149–164, 2015.

BORCHARD, G.; ESMAEILI, F.; HEUKING, S. Chitosan-Based Delivery Systems for Mucosal Vaccination. In: SARMENTO, B.; NEVES, J. (Eds.). Chitosan-Based Systems for Biopharmaceutics: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics. Chichester: John Wiley & Sons, 2012. p. 211–224.

BOUROGÂA, H.; MILED, K.; GRIBÂA, L.; EL BEHI, I.; GHRAM, A. Characterization of New Variants of Avian Infectious Bronchitis Virus in Tunisia. **Avian Diseases**, v. 53, n. 3, p. 426–433, 2009.

BRITTON, P.; ARMESTO, M.; CAVANAGH, D.; KEEP, S. Modification of the avian coronavirus infectious bronchitis virus for vaccine development. **Bioengineered Bugs**, v. 3, n. 2, p. 114–119, 2012.

BRONZONI, R. V. M.; MONTASSIER, M. F. S.; PEREIRA, G. T.; GAMA, N. M.; SAKAI, V.; MONTASSIER, H. J. Detection of infectious bronchitis virus and specific anti-viral antibodies using a Concanavalin A-Sandwich-ELISA. **Viral immunology**, v. 18, n. 3, p. 569–78, 2005.

CARON, L. F. Etiology and immunology of infectious bronchitis virus. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 12, n. 2, p. 115–119, 2010.

CARRANZA, C.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; SANTANDER PARRA, S. H.; NUÑEZ, L. F. N.; PENZES, Z.; CHACÓN, J. L.; SESTI, L.; CHACÓN, R. D.; PIANTINO FERREIRA, A. J. Genetic characterisation and analysis of infectious bronchitis virus isolated from Brazilian flocks between 2010 and 2015. *British Poultry Science*, v. 58, n. 6, p. 610-623, 2017.

CASAI, R.; THIEL, V.; SIDDELL, S.G.; CAVANAGH, D.; BRITTON, P. Reverse Genetics System for the Avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus. **Journal of Virology**, v. 75, n. 24, p. 12359–12369, 2001.

CAVANAGH, D. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A.**, v. 32, n. 6, p. 567–582, 2003.

CAVANAGH, D. Coronaviruses in poultry and other birds. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A.**, v. 34, n. 6, p. 439–448, 2005.

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Veterinary Research**, v. 38, n. 2, p. 281–297, 2007.

CHACÓN, J. L.; RODRIGUES, J. N.; ASSAYAG JUNIOR, M. S.; PELOSO, C.; PEDROSO, A. C.; FERREIRA, A. J. Epidemiological survey and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in Brazil between 2003 and 2009. **Avian Pathology**, v. 40, n. 2, p. 153–162, 2011.

CHACÓN, J. L.; ASSAYAG JR., M. S.; REVOLLEDO, L.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; VEJARANO, M. P.; JONES, R. C.; PIANTINO FERREIRA, A. J. Pathogenicity and molecular characteristics of infectious bronchitis virus (IBV) strains isolated from broilers showing diarrhoea and respiratory disease. **British poultry science**, v. 55, n. 3, p. 271–83, 2014.

CHACÓN, J. L.; VEJARANO, P.; SOUZA, L.; NAGY, Z.; PENZES, Z. Homologous and heterologous protection against Brazilian BR-I viruses of Infectious Bronchitis. 2016 PSA Annual Meeting. **Anais...** New Orleans: 2016. Disponível em: <https://aaap.memberclicks.net/assets/2016_Annual_Meeting/aaap_proceedings_2016.pdf>

CHEN, B. Y.; HOSI, S.; NUNOYA, T.; ITAKURA, C. Histopathology and immunohistochemistry of renal lesions due to infectious bronchitis virus in chicks. **Avian Pathology**, v. 25, n. 2, p. 269–283, 1996.

CHHABRA, R.; CHANTREY, J.; GANAPATHY, K. Immune Responses to Virulent and Vaccine Strains of Infectious Bronchitis Viruses in Chickens. **Viral immunology**, v. 28, n. 9, p. 478–88, 2015.

CHHABRA, R.; FORRESTER, A.; LEMIERE, S.; AWAD, F.; CHANTREY, J.; GANAPATHY, K. Mucosal, cellular, and humoral immune responses induced by different live infectious bronchitis virus vaccination regimes and protection conferred against infectious bronchitis virus Q1 strain. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, n. 9, p. 1050–1059, 2015.

CHOUSALKAR, K. K.; CHEETHAM, B. F.; ROBERTS, J. R. LNA probe-based real-time RT-PCR for the detection of infectious bronchitis virus from the oviduct of unvaccinated and vaccinated laying hens. **Journal of Virological Methods**, v. 155, n. 1, p. 67–71, 2009.

- CHOUSALKAR, K. K.; ROBERTS, J. R. Ultrastructural study of infectious bronchitis virus infection in infundibulum and magnum of commercial laying hens. **Veterinary Microbiology**, v. 122, n. 3–4, p. 223–236, 2007.
- CHU, B. W.; KOBIASI, M. A.; ZENG, W.; MAINWARING, D.; JACKSON, D. C. Chitosan-based particles as biocompatible delivery vehicles for peptide and protein-based vaccines. **Procedia in Vaccinology**, v. 6, p. 74–79, 2012.
- CHUA, B. Y.; AL KOBASI, M.; ZENG, W.; MAINWARING, D.; JACKSON, D. C. Chitosan microparticles and nanoparticles as biocompatible delivery vehicles for peptide and protein-based immunocontraceptive vaccines. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 1, p. 81–90, 2012.
- CIFUENTES-RINCÓN, A.; LOPES, P. D.; SANMIGUEL P, R. A. Genotyping of news variants of the avian infectious bronchitis virus from Tolima department, Colombia . **Rev.MVZ Córdoba**, v. 21, n. 3, p. 5500–5510, 2016.
- COLLISSON, E. W.; PEI, J.; DZIELAWA, J.; SEO, S. H. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry. **Developmental and comparative immunology**, v. 24, n. 2–3, p. 187–200, 2000.
- COLVERO, L. P.; VILLARREAL, L. Y.; TORRES, C. A.; BRAÑDO, P. E. Assessing the economic burden of avian infectious bronchitis on poultry farms in Brazil. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 34, n. 3, p. 993–9, 2015.
- CONG, F.; LIU, X.; HAN, Z.; SHAO, Y.; KONG, X.; LIU, S. Transcriptome analysis of chicken kidney tissues following coronavirus avian infectious bronchitis virus infection. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 743, 2013.
- COOK, J. K.; JACKWOOD, M.; JONES, R. C. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. **Avian Pathology**, v. 41, n. 3, p. 239–50, 2012.
- CORSE, E.; MACHAMER, C. E. The cytoplasmic tails of infectious bronchitis virus E and M proteins mediate their interaction. **Virology**, v. 312, n. 1, p. 25–34, 2003.
- CSABA, N.; GARCIA-FUENTES, M.; ALONSO, M. J. Nanoparticles for nasal vaccination. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 2, p. 140–157, 2009.
- DARBYSHIRE, J. H. Assessment of cross-immunity dm chickens to strains of avian infectious bronchitis virus using tracheal organ cultures. **Avian Pathology**, v. 9, n. 2, p. 179–184, 1980.
- DE WIT, J. J.; SWART, W. A. J. M.; FABRI, T. H. F. Efficacy of infectious bronchitis virus vaccinations in the field: association between the α -IBV IgM response, protection and vaccine application parameters. **Avian Pathology**, v. 39, n. 2, p. 123–131, 2010.

DEVILLE, S.; AROUS, J. B.; BERTRAND, F.; BORISOV, V.; DUPUIS, L. Efficacy of intranasal and spray delivery of adjuvanted live vaccine against infectious bronchitis virus in experimentally infected poultry. **Procedia in Vaccinology**, v. 6, p. 85–92, 2012. DOLZ, R.; PUJOLS, J.; ORDÓÑEZ, G.; PORTA, R.; MAJÓ, N. Antigenic and molecular characterization of isolates of the Italy 02 infectious bronchitis virus genotype. **Avian Pathology**, v. 35, n. 2, p. 77–85, 2006.

DOWNING, T.; LLOYD, A. T.; O'FARRELLY, C.; BRADLEY, D. G. The Differential Evolutionary Dynamics of Avian Cytokine and TLR Gene Classes. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 12, p. 6993–7000, 2010.

DUPUIS, L.; ASCARATEIL, S.; AUCOUTURIER, J.; GANNE, V. SEPPIC vaccine adjuvants for poultry. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1081, 2006

DZUNG, N. A.; HÀ, N. T. N.; VAN, D. T. H.; PHUONG, N. T. L.; QUYNH, N. T. N.; HIEP, D. M.; HIEP, L. V. Chitosan nanoparticle as a novel delivery system for A/H1N1 Influenza vaccine: safe property and immunogenicity in mice. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 60, p. 1839–1846, 2011.

EL NAGGAR, H. M.; MADKOUR, M. S.; HUSSEIN, H. A. Preparation of mucosal nanoparticles and polymer-based inactivated vaccine for Newcastle disease and H9N2 AI viruses. **Veterinary World**, v. 10, n. 2, p. 187–193, 2017.

ESMAEILI, F.; HEUKING, S.; JUNGINGER, H. E.; BORCHARD, G. Progress in chitosan-based vaccine delivery systems. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 20, n. 1, p. 53-61, 2010.

Farmacopeia Europeia 8.0. Disponível em: <<http://online6.edqm.eu/ep800/>>. Acesso em 20 de jun de 2017.

FAN, W.; YAN, W.; XU, Z.; NI, H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, n. 1, p. 21–27, 2012.

FERNANDO, F. S.; MONTASSIER, M. F. S.; SILVA, K. R.; OKINO, C. H.; OLIVEIRA, E. S.; FERNANDES, C. C.; BANDARRA, M. B.; GONÇALVES, M. C. M.; BORZI, M. M.; SANTOS, R. M.; VASCONCELOS, R. O.; ALESSI, A. C.; MONTASSIER, H. J. Nephritis associated with a S1 Variant Brazilian isolate of infectious bronchitis virus and vaccine protection test in experimentally infected chickens. **International Journal of Poultry Science**, v. 12, n. 11, p. 639–646, 2013.

FERNANDO, F. S.; OKINO, C. H.; SILVA, K. R.; FERNANDES, C. C.; GONÇALVES, M. C.M.; MONTASSIER, M. F. S.; VASCONCELOS, R. O.; MONTASSIER, H. J. Increased expression of Interleukin-6 related to nephritis in chickens challenged with an Avian infectious bronchitis virus variant. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 35, n. 3, p. 216–222, 2015.

FRAGA, A. F.; BALESTRIN, E.; IKUTA, N.; FONSECA, A. S.; SPILKI, F. R.; CANAL, C. W.; LUNGE, V. R. Emergence of a New Genotype of Avian Infectious Bronchitis Virus in Brazil. **Lunge Source: Avian Diseases**, v. 57, n. 2, p. 225–232, 2013.

GAN, Q.; WANG, T.; COCHRANE, C.; MCCARRON, P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 44, n. 2–3, p. 65–73, 2005.

GAN, Q.; WANG, T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 59, n. 1, p. 24–34, 2007.

GARÇON, N.; LEROUX-ROELS, G.; CHENG, W. F. Vaccine adjuvants. **Perspectives in Vaccinology**, v. 1, n. 1, p. 89–113, 2011.

GELB JR., J.; WOLFF, J. B.; MORAN, C. A. Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. **Avian Disease**, v. 35, n. 1, p. 82–87, 1991.

GREGORY, A. E.; TITBALL, R.; WILLIAMSON, D. Vaccine delivery using nanoparticles. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, p. 1-13, 2013.

GRGIÆ, H.; HUNTER, D. B.; HUNTON, P.; NAGY, E. Pathogenicity of infectious bronchitis virus isolates from Ontario chickens. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 72, n. 5, p. 403–410, 2008.

GURJAR, R. S.; GULLEY, S. L.; VAN GINKEL, F. W. Cell-mediated immune responses in the head-associated lymphoid tissues induced to a live attenuated avian coronavirus vaccine. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 41, n. 4, p. 715-722, 2013.

HAM, J. Y.; SHIN, Y. S.; SHOFFNER, R. N.; GUISE, K. S. Stable transformation of cultured chicken cells. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v. 6, n. 4, p. 581-589, 1993.

HEEGAARD, P. M.; FANG, Y.; JUNGENSEN, G. Novel adjuvants and immunomodulators for veterinary vaccines. **Methods in Molecular Biology**, v. 1349, p. 63–82, 2016.

HOLMES, H. C. Virus-neutralizing antibody in sera and secretions of the upper and lower respiratory tract of chickens inoculated with live and inactivated Newcastle disease virus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 89, n. 1, p. 21–29, 1979.

IGNJATOVIĆ, J.; GALLI, L. The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. **Archives of Virology**, v. 138, n. 1–2, p. 117–134, 1994.

IGNJATOVIĆ, J.; SAPATS, S. Avian infectious bronchitis virus. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 19, n. 2, p. 493–508, 2000.

ILLUM, L.; JABBAL-GILL, I.; HINCHCLIFFE, M.; FISHER, A. N.; DAVIS, S. S. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v, 51, n. 1-3, p. 81-96, 2001.

JACKWOOD, M. W. Review of Infectious Bronchitis Virus Around the World. **Avian Diseases**, v. 56, n. 4, p. 634–641, 2012.

JACKWOOD, M. W.; JORDAN, B. J.; ROH, H. J.; HILT, D. A.; WILLIAMS, S. M. Evaluating Protection Against Infectious Bronchitis Virus by Clinical Signs, Ciliostasis, Challenge Virus Detection, and Histopathology. **Avian Disease**, v. 59, n. 3, p. 368–74, 2015.

JANG, S. I.; LILLEHOJ, H. S.; LEE, S. H.; LEE, K. W.; PARK, M. S.; BAUCHAN, G. R.; LILLEHOJ, E. P.; BERTRAND, F.; DUPUIS, L.; DEVILLE, S. Immunoenhancing effects of Montanide™ ISA oil-based adjuvants on recombinant coccidia antigen vaccination against *Eimeria acervulina* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 172, n. 3–4, p. 221–228, 2010.

JANG, S. I.; LILLEHOJ, H. S.; LEE, S. H.; LEE, K. W.; LILLEHOJ, E. P.; BERTRAND, F.; DUPUIS, L.; DEVILLE, S. Montanide™ ISA 71 VG adjuvant enhances antibody and cell-mediated immune responses to profilin subunit antigen vaccination and promotes protection against *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella*. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 178–183, 2011.

JANG, S. I.; LILLEHOJ, H. S.; LEE, S. H.; LEE, K. W.; LILLEHOJ, E. P.; HONG, Y. H.; AN, D. J.; JEONG, W.; CHUN, J. E.; BERTRAND, F.; DUPUIS, L.; DEVILLE, S.; AROUS, J. B. Vaccination with *Clostridium perfringens* recombinant proteins in combination with Montanide™ ISA 71 VG adjuvant increases protection against experimental necrotic enteritis in commercial broiler chickens. **Vaccine**, v. 30, n. 36, p. 5401–5406, 2012.

JANG, S. I.; KIM, D. K.; LILLEHOJ, H. S.; LEE, S. H.; LEE, K. W.; BERTRAND, F.; DUPUIS, L.; DEVILLE, S.; AROUS, J. B.; LILLEHOJ, E. P. Evaluation of Montanide™ ISA 71 VG Adjuvant during Profilin Vaccination against Experimental Coccidiosis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

JOHNSON, M. A.; POOLEY, C.; IGNJATOVIC, J.; TYACK, S. G. A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus. **Vaccine**, v. 21, n. 21–22, p. 2730–2736, 2003.

JORDAN, B. Vaccination against infectious bronchitis virus: A continuous challenge. **Veterinary Microbiology**, n. 2016, 2017.

KAIKABO, A. A.; ABDULKARIM, S. M.; ABAS, F. Evaluation of the efficacy of chitosan nanoparticles loaded Φ KAZ14 bacteriophage in the biological control of colibacillosis in chickens. **Poultry science**, v. 96, p. 295–302, 2017.

KAISER, P.; BALIC, A. The Avian Immune System. In: Scanes, C. G. **Sturkie's Avian Physiology**. 6. ed. Amsterdam: Elsevier, 2015. cap. 17, p. 403–418.

KAMEKA, A. M.; HADDADI, S.; KIM, D. S.; CORK, S. C.; ABDUL-CAREEM, M. F. Induction of innate immune response following infectious bronchitis corona virus infection in the respiratory tract of chickens. **Virology**, v. 450–451, p. 114–121, 2014.

KAPCZYNSKI, D. R.; HILT, D. A.; SHAPIRO, D.; SELLERS, H. S.; JACKWOOD, M. W. Protection of chickens from infectious bronchitis by in ovo and intramuscular vaccination with a DNA vaccine expressing the S1 glycoprotein. **Avian diseases**, v. 47, n. 2, p. 272–285, 2003.

KEEP, S. M.; BICKERTON, E.; BRITTON, P. Transient dominant selection for the modification and generation of recombinant infectious bronchitis coronaviruses. In: _____ (Ed.). **Coronaviruses: Methods and Protocols**. New York: Humana Press, 2015. cap. 12, p. 115–133.

KEEP, S. M.; BICKERTON, E.; BRITTON, P. Reverse Genetics of Avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus. **Animal Coronaviruses**, p. 53–72, 2016.

KLIMKA, A.; MICHELS, L.; GLOWALLA, E.; TOSETTI, B.; KRÖNKE, M.; KRUT, O. Montanide ISA 71 VG is Advantageous to Freund's Adjuvant in Immunization Against *S. aureus* Infection of Mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 81, n. 5, p. 291–297, 2015.

KOPPOLU, B.; ZAHAROFF, D. A. The effect of antigen encapsulation in chitosan particles on uptake, activation and presentation by antigen presenting cells. **Biomaterials**, v. 34, n. 9, p. 2359–2369, 2013.

KUMAR, M.; BEHERA, A. K.; LOCKEY, R. F.; ZHANG, J.; BHULLAR, G.; DE LA CRUZ, C. P.; CHEN, L. C.; LEONG, K. W.; HUANG, S. K.; MOHAPATRA, S. S. Intranasal gene transfer by chitosan-DNA nanospheres protects BALB/c mice against acute respiratory syncytial virus infection. **Human gene therapy**, v. 13, n. 12, p. 1415–1425, 2002.

LANCELLOTTI, M.; MONTASSIER, M. F. S.; FERNANDO, F. S.; SILVA, K. F.; OKINO, C. H.; SANTOS, I. L.; SANTOS, R. M.; BORZI, M. M.; ALESSI, A. C.; PEREIRA, G. T.; MONTASSIER, H. J. Relationship between mucosal antibodies and immunity against avian infectious bronchitis virus. **International Journal of Poultry Science**, v. 13, n. 3, p. 138–144, 2014.

LEROUX-ROELS, G. Unmet needs in modern vaccinology. Adjuvants to improve the immune response. **Vaccine**, v. 28, n. SUPPL. 3, 2010.

LIU, G.; WANG, Q.; LIU, N.; XIAO, Y.; TONG, T.; LIU, S.; WU, D. Infectious bronchitis virus nucleoprotein specific CTL response is generated prior to serum IgG. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 148, n. 3–4, p. 353–358, 2012.

LIU, H.; GAO, C. Preparation and properties of ionically cross-linked chitosan nanoparticles. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 20, n. 7, p. 613–619, 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LONE, N. A.; SPACKMAN, E.; KAPCZYNSKI, D. Immunologic evaluation of 10 different adjuvants for use in vaccines for chickens against highly pathogenic avian influenza virus. **Vaccine**, v. 35, p. 3401–3408, 2017.

MANOLOVA, V.; FLACE, A.; BAUER, M.; SCHWARZ, K.; SAUDAN, P.; BACHMANN, M. F. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 5, p. 1404–1413, 2008.

MATTU, C.; LI, R.; CIARDELLI, G. Chitosan nanoparticles as therapeutic protein nanocarriers: The effect of ph on particle formation and encapsulation efficiency. **Polymer Composites**, v. 34, n. 9, p. 1538–1545, 2013.

McDOUGALL, J. S. Avian infectious bronchitis: the protection afforded by an inactivated virus vaccine. **The Veterinary record**. v. 85, n. 14, p. 378-381, 1969.

MEIR, R.; ROSENBLUT, E.; PERL, S.; KASS, N.; AYALI, G.; PERK, S.; HEMSANI, E. Identification of a Novel Nephropathogenic Infectious Bronchitis Virus in Israel. **Avian Diseases**, v. 48, n. 3, p. 635–641, 2004.

MO, M.; HUANG, B.; WEI, P.; WEI, T.; CHEN, Q.; WANG, X.; LI, M.; FAN, W. Complete Genome Sequences of Two Chinese Virulent Avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus Variants. **Journal of Virology**, v. 86, n. 19, p. 10903–10904, 2012.

MO, M. L.; LI, M.; HUANG, B. C.; FAN, W. S.; WEI, P.; WEI, T. C.; CHENG, Q. Y.; WEI, Z. J.; LANG, Y. H. Molecular characterization of major structural protein genes of avian coronavirus infectious bronchitis virus isolates in southern china. **Viruses**, v. 5, n. 12, p. 3007–3020, 2013.

MOHAMMADPOUR DOUNIGHI, N.; ESKANDARI, R.; AVADI, M. R.; ZOLFAGHARIAN, H.; MIR MOHAMMAD SADEGHI, A.; REZAYAT, M. Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles containing Mesobuthus eupeus scorpion venom as an antigen delivery system. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 18, n. 1, p. 44–52, 2012.

MONDAL, S. P.; NAQI, S. A. Maternal antibody to infectious bronchitis virus: Its role in protection against infection and development of active immunity to vaccine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 79, n. 1–2, p. 31–40, 2001.

MONTASSIER, H. Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 12, n. 2, p. 87–96, 2010.

MONTASSIER, M. F. S.; BENTRANO, L.; MONTASSIER, H. J.; RICHTZENHAIN, L. J. Genetic grouping of avian infectious bronchitis virus isolated in Brazil based on RT-PCR/RFLP analysis of the S1 gene. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 190–194, 2008.

MONTASSIER, M. F. S.; BRENTANO, L.; RICHTZENHAIN, L. J.; MONTASSIER, H. J. Molecular analysis and evolution study of infectious bronchitis viruses isolated in Brazil over a twenty-one-year period. In: International Symposium on Avian Corona and Pneumoviruses and Complicating Pathogens, 7. 2012, Wetter. **Resumos...** Druckerei Schoreder, Wetter, Germany, 2012. p.19-30.

MOON, J. J.; HUANG, B.; IRVINE, D. J. Engineering Nano- and microparticles to tune immunity. **Advanced Materials**, v. 24, n. 28, p. 3724–3746, 2012.

MOORE, K. M.; BENNETT, J. D.; SEAL, B. S.; JACKWOOD, M.W. Sequence comparison of avian infectious bronchitis virus S1 glycoproteins of the Florida serotype and five variant isolates from Georgia and California. **Virus Genes**, v. 17, n. 1, p. 63–83, 1998.

NAGPAL, K.; SINGH, S. K.; MISHRA, D. N. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 58, n. 11, p. 1423–1430, 2010.

NAKAMURA, K.; COOK, J. K.; OTSUKI, K.; HUGGINS, M. B.; FRAZIER, J. A. Comparative study of respiratory lesions in two chicken lines of different susceptibility infected with infectious bronchitis virus: histology, ultrastructure and immunohistochemistry. **Avian pathology: journal of the W.V.P.A**, v. 20, n. 2, p. 241–257, 1991.

NIKURA, K.; MATSUNAGA, T.; SUZUKI, T.; KOBAYASHI, S.; YAMAGUCHI, H.; ORBA, Y.; KAWAGUCHI, A.; HASEGAWA, H.; KAJINO, K.; NINOMIYA, T.; IJIRO, K.; SAWA, H. Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. **ACS Nano**, v. 7, n. 5, p. 3926–3938, 2013.

O'HAGAN, D. T.; SINGH, M. Microparticles as vaccine adjuvants and delivery systems. **Expert review of vaccines**, v. 2, n. 2, p. 269–283, 2003.

OIE. Avian Infectious Bronchitis. **OIE Terrestrial Manual**, v. 2.3.2, p. 1–16, 2013.

OKINO, C. H.; ALESSI, A. C.; MONTASSIER, M. F. S.; ROSA, A. J.; WANG, X.; MONTASSIER, H. J. Humoral and cell-mediated immune responses to different doses of attenuated vaccine against avian infectious bronchitis virus. **Viral immunology**, v. 26, n. 4, p. 259–267, 2013.

OKINO, C. H.; DOS SANTOS, I. L.; FERNANDO, F. S.; ALESSI, A. C.; WANG, X.; MONTASSIER, H. J. Inflammatory and cell-mediated immune responses in the respiratory tract of chickens to infection with avian infectious bronchitis virus. **Viral immunology**, v. 27, n. 8, p. 383–91, 2014.

OKINO, C. H.; MORES, M. A.; TREVISOL, I. M.; COLDEBELLA, A.; MONTASSIER, H. J.; BRENTANO, L. Early immune responses and development of pathogenesis of avian infectious bronchitis viruses with different virulence profiles. **Plos One**, v. 12, n. 2, p. e0172275, 2017.

OLÁH, I.; NAGY, N.; VERVELDE, L. Structure of the Avian Lymphoid System. In: Schat, K. A.; Kaspers, B.; Kaiser, P. (Eds.). **Avian Immunology: Second Edition**. Amsterdam: Elsevier Inc, 2013. p. 11-44.

OTSUKI, K.; NAKAMURA, T.; KUBOTA, N.; KAWAOKA, Y.; TSUBOKURA, M. Comparison of two strains of avian infectious bronchitis virus for their interferon induction, viral growth and development of virus-neutralizing antibody in experimentally-infected chickens. **Veterinary Microbiology**, v. 15, n. 1–2, p. 31–40, 1987.

OWEN, R. L.; COWEN, B. S.; HATTEL, A. L.; NAQI, S. A.; WILSON, R. A. Detection of viral antigen following exposure of one-day-old chickens to the Holland 52 strain of infectious bronchitis virus. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A**, v. 20, n. 4, p. 663–73, 1991.

OYEWUMI, M. O.; KUMAR, A.; CUI, Z. Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses. **Expert review of vaccines**, v. 9, n. 9, p. 1095–107, 2010.

PEI, J.; SEKELICK, M. J.; MARCUS, P. I.; CHOI, I. S.; COLLISSON, E. W. Chicken Interferon Type I Inhibits Infectious Bronchitis Virus Replication and Associated Respiratory Illness. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 21, n. 12, p. 1071–1077, 2001.

PETROVSKY, N.; AGUILAR, J. C. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. **Immunology and Cell Biology**, v. 82, p. 488–496, 2004.

PIPKIN, M. E.; LIEBERMAN, J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. **Current opinion in immunology**, v. 19, n. 3, p. 301-308, 2007.

POHUANG, T.; CHANSIRIPORNCHAI, N.; TAWATSIN, A.; SASIPREEYAJAN, J. Detection and molecular characterization of infectious bronchitis virus isolated from recent outbreaks in broiler flocks in Thailand. **Journal of Veterinary Science**, v. 10, n. 3, p. 219–223, 2009.

RAJ, G. D.; JONES, R. C. Infectious bronchitis virus: Immunopathogenesis of infection in the chicken. **Avian Pathology**, v. 26, n. 4, p. 677–706, 1997.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, n. 3, p. 493–497, 1938.

RIMONDI, A.; CRAIG, M. I.; VAGNOZZI, A.; KÖNIG, G.; DELAMER, M.; PEREDA, A. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains from outbreaks in Argentina (2001–2008). **Avian pathology : journal of the W.V.P.A**, v. 38, n. 2, p. 149–153, 2009.

SANTOS, R. M. **Desenvolvimento e avaliação de uma vacina inativada contra estirpe variante brasileira do vírus da bronquite infecciosa aviária**. 2014. 69 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2014.

SAWAENGSACK, C.; MORI, Y.; YAMANISHI, K.; MITREVEJ, A.; SINCHAIPANID, N. Chitosan nanoparticle encapsulated hemagglutinin-split influenza virus mucosal vaccine. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 2, p. 317–25, 2014.

SEO, S. H.; COLLISSON, E. W. Specific cytotoxic T lymphocytes are involved in in vivo clearance of infectious bronchitis virus. **Journal of virology**, v. 71, n. 7, p. 5173–7, 1997.

SINGH, M.; O'HAGAN, D. T. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. **International Journal for Parasitology**, 2003.

SJAAK DE WIT, J. J.; COOK, J. K. A; VAN DER HEIJDEN, H. M. J. F. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A**, v. 40, n. 3, p. 223–235, 2011.

SMITH, D. M.; SIMON, J. K.; BAKER, J. R. Applications of nanotechnology for immunology. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 8, p. 592–605, 2013.

SPICKLER, A. R.; ROTH, J. A. Adjuvants in Veterinary Vaccines: Modes of Action and Adverse Effects. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 3, p. 273–281, 2003.

TAN, L.; ZHANG, Y.; LIU, F.; YUAN, Y.; ZHAN, Y.; SUN, Y.; QIU, X.; MENG, C.; SONG, C.; DING, C. Infectious bronchitis virus poly-epitope-based vaccine protects chickens from acute infection. **Vaccine**, v. 34, n. 44, p. 5209–5216, 2016.

TANG, M.; WANG, H.; ZHOU, S.; TIAN, G. Enhancement of the immunogenicity of an infectious bronchitis virus DNA vaccine by a bicistronic plasmid encoding nucleocapsid protein and interleukin-2. **Journal of Virological Methods**, v. 149, n. 1, p. 42–48, 2008.

TORO, H.; FERNANDEZ, I. Avian infectious bronchitis: specific lachrymal IgA level and resistance against challenge. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 41, p. 467–472, 1994.

TORO, H.; ZHANG, J. F.; GALLARDO, R. A.; VAN SANTEN, V. L.; VAN GINKEL, F. W.; JOINER, K. S.; BREEDLOVE, C. S1 of Distinct IBV Population Expressed from Recombinant Adenovirus Confers Protection Against Challenge. **Avian Diseases**, v. 58, n. 2, p. 211–215, 2014a.

TORO, H.; ZHAO, W.; BREEDLOVE, C.; ZHANG, Z.; YU, Q.; VAN SANTEN, V. Infectious Bronchitis Virus S2 Expressed from Recombinant Virus Confers Broad Protection Against Challenge. **Avian Diseases**, v. 58, n. 1, p. 83–89, 2014b.

UMAR, S.; SHAH, M. A. A.; MUNIR, M. T.; AHSAN, U.; KABOUDI, K. Infectious bronchitis virus: evolution and vaccination. **Worlds Poultry Science Journal**, v. 72, n. 1, p. 49–60, 2016.

VAN DER LUBBEN, I. M.; VERHOEF, J. C.; BORCHARD, G.; JUNGINGER, H. E. Chitosan for mucosal vaccination. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, n. 2, p. 139–144, 2001.

VILLARREAL, L. Y. B.; SANDRI, T. L.; SOUZA, S. P.; RICHTZENHAIN, L. J.; DE WIT, J. J.; BRANDAO, P. E. Molecular Epidemiology of Avian Infectious Bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in Breeders, Broilers, and Layers. **Avian Diseases**, v. 54, n. 2, p. 894–898, 2010.

VOLKOVA, M. A.; IRZA, A.; CHVALA, I.; FROLOV, S.; DRYGIN, V. KAPCZYNSKI, D. Adjuvant effects of chitosan and calcium phosphate particles in an inactivated newcastle disease vaccine. **Avian Diseases**, v. 58, n. 1, p. 46–52, 2014.

XU, Y.; ZHANG, T.; XU, Q.; HAN, Z.; LIANG, S.; SHAO, Y.; MA, D.; LIU, S. Differential modulation of avian B-defensin and Toll-like receptor expression in chickens infected with infectious bronchitis virus. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 21, p. 9011–9024, 2015.

ZHANG, T.; LI, D.; JIA, Z.; CHANG, J.; HOU, X. Cellular immune response in chickens infected with avian infectious bronchitis virus (IBV). **European Journal of Inflammation**, v. 15, n. 1, p. 35–41, 2017.

ZHANG, Y.; WANG, H. N.; WANG, T.; FAN, W. Q.; ZHANG, A. Y.; WEI, K.; TIAN, G. B.; YANG, X. Complete genome sequence and recombination analysis of infectious bronchitis virus attenuated vaccine strain H120. **Virus Genes**, v. 41, n. 3, p. 377–388, 2010a.

ZHANG, W.; YIN, Z.; LIU, N.; YANG, T.; WANG, J.; BU, Z.; WU, D. DNA–chitosan nanoparticles improve DNA vaccine-elicited immunity against Newcastle disease virus through shuttling chicken interleukin-2 gene. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, n. 8, p. 693–702, 2010b.

ZHAO, K.; CHEN, G.; SHI, X. M.; GAO, T. T.; LI, W.; ZHAO, Y.; ZHANG, F. Q.; WU, J.; CUI, X.; WANG, Y. F. Preparation and Efficacy of a Live Newcastle Disease Virus Vaccine Encapsulated in Chitosan Nanoparticles. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1–11, 2012.

ZHAO, K.; ZHANG, Y.; ZHANG, X.; LI, W.; SHI, C.; GUO, C.; DAI, C.; CHEN, Q.; JIN, Z.; ZHAO, Y.; CUI, H.; WANG, Y. Preparation and efficacy of newcastle disease virus DNA vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 389–402, 2014a.

ZHAO, K.; RONG, G.; HAO, Y.; YU, L.; KANG, H.; WANG, X.; WANG, X.; JIN, Z.; REN, Z.; LI, Z. IgA response and protection following nasal vaccination of chickens with Newcastle disease virus DNA vaccine nanoencapsulated with Ag@SiO₂ hollow nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 1–12, 2016.

ZHAO, L.; SETH, A.; WIBOWO, N.; ZHAO, C. X.; MITTER, N.; YU, C.; MIDDELBERG, A. P. J. Nanoparticle vaccines. **Vaccine**, 2014b.

ZHAO, R.; SUN, J.; QI, T.; ZHAO, W.; HAN, Z.; YANG, X.; LIU, S. Recombinant Newcastle disease virus expressing the infectious bronchitis virus S1 gene protects chickens against Newcastle disease virus and infectious bronchitis virus challenge. **Vaccine**, v. 35, n. 18, p. 2435–2442, 2017.

YAN, F.; ZHAO, Y.; HU, Y.; QIU, J.; LEI, W.; JI, W.; LI, X.; WU, Q.; SHI, X.; LI, Z. Protection of chickens against infectious bronchitis virus with a multivalent DNA vaccine and boosting with an inactivated vaccine. **Journal of Veterinary Science**, v. 14, n. 1, p. 53–60, 2013.

WANG, C. H.; HUANG, Y. C. Relationship between serotypes and genotypes based on the hypervariable region of the S1 gene of infectious bronchitis virus. **Archives of Virology**, v. 145, n. 2, p. 291-300, 2000.

WEN, Z. S.; XU, Y. L.; ZOU, X. T.; XU, Z. R. Chitosan Nanoparticles Act as an Adjuvant to Promote both Th1 and Th2 Immune Responses Induced by Ovalbumin in Mice. **Marine Drugs**, v. 9, n. 6, p. 1038–1055, 2011.

WILLIAMS, A. K.; WANG, L.; SNEED, L. W.; COLLISSON, E. W. Comparative analyses of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronaviruses. **Virus Research**, v. 25, n. 3, p. 213–222, 1992.