

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 17/05/2019

**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

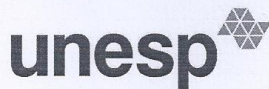
Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientador: Helio José Montassier
Coorientadora: Renata Fonseca Vianna Lopez
Banca examinadora: Cintia Hiromi Okino, Rafael Antônio Cesarin Penha Filho, Edison Luiz Durigon, Rosângela Zacarias Machado

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

COORIENTADORA: 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. ROSÂNGELA 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 5º e 11º 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 imunoprofilaxia 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 imuno-competentes (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.

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 efectoras 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 Biopharmaceuticals: 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.

GRGIAE, 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.

IGNJATOVIC, 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 ΦKAZ14 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.

NIIKURA, 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.

SAWAENGSAK, 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.; COLLISSE, 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.