



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**PRODUÇÃO DE NANOVACINAS CONTRA O VÍRUS DA
BRONquite INFECCIOSA DAS GALINHAS**

Lucas Marcelino Ribeiro de Oliveira
Orientador: Prof. Dr. Francisco Ernesto Moreno Bernal

BRASÍLIA – DF
JULHO/2017



LUCAS MARCELINO RIBEIRO DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE NANOVACINAS CONTRA O VÍRUS DA
BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS**

Trabalho de conclusão de curso de
graduação em Medicina Veterinária
apresentado junto à Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Ernesto Moreno Bernal

BRASÍLIA – DF
JULHO/2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Lucas Marcelino Ribeiro de

Produção de nanovacinas contra o vírus da bronquite infecciosa das galinhas / Lucas Marcelino Ribeiro de Oliveira; orientação de Francisco Ernesto Moreno Bernal. – Brasília, 2017.

45 p.: il.

Trabalho de conclusão de curso de graduação – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2017.

CESSÃO DE DIREITOS

Nome do autor: Lucas Marcelino Ribeiro de Oliveira

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Produção de nanovacinas contra o vírus da bronquite infecciosa das galinhas.

Ano: 2017

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.



Lucas Marcelino Ribeiro de Oliveira

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do Autor: OLIVEIRA, Lucas Marcelino Ribeiro de

Título: Produção de nanovacinas contra o vírus da bronquite infecciosa das galinhas.

Trabalho de conclusão do curso de graduação em Medicina Veterinária apresentado junto à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Aprovado em 06/07/2017

Banca Examinadora

Prof. Dr. Francisco Ernesto Moreno Bernal

Universidade de Brasília

Julgamento: Aprovado

Assinatura 

Prof.^a Dr.^a Simone Perecmanis

Universidade de Brasília

Julgamento: APROVADO

Assinatura 

Prof. Dr. Fabrício Souza Campos

Universidade de Brasília

Julgamento: APROVADO

Assinatura 

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço todos os meus professores, não apenas pelos ensinamentos profissionais e acadêmicos, mas também por todo o suporte, amizade e orientação pessoal. Meu eterno apreço por Adriana Almeida, Angela Patrícia Santana, Angelo Berchieri Jr., Diego Batista, Fernanda Barbosa, Francisco Bernal, Imelda McGonnell, Marcia Ferreira e Simone Perecmanis. Sem vocês teria sido impossível chegar até aqui.

Agradeço minha mãe Lêda, meu pai Wagner, minha madrastra Alessandra e minhas irmãs Wanessa e Sara por todo o apoio que me deram em todas as minhas escolhas. Agradeço também todos os meus familiares, em especial minha tia Kátia, meu tio Marcelo e meus primos Alexandre, Inácio e Guilherme por terem me acolhido como filho e irmão em uma cidade nova, me ajudando sempre com tudo que precisei.

Por último, mas não menos importantes: aos meus amigos inseparáveis da Alcateia e da *London Family*. Agradeço por sempre estarem ao meu lado me ajudando a superar desafios e me mostrando que sempre somos capazes. Obrigado por todas as experiências incríveis que me proporcionaram desde que nos conhecemos!

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
1 Bronquite infecciosa das galinhas.....	9
1.1 Patogenia	9
1.2 Agente etiológico e suas características.....	11
1.3 Diagnóstico	13
1.3.1 Isolamento viral	14
1.3.2 Diagnóstico sorológico	16
1.3.3 Diagnóstico molecular	17
1.3.4 Diagnóstico diferencial	18
1.4 Prevenção e controle	18
1.5 Vacinação	19
1.5.1 Histórico das vacinas	19
1.5.2 Programas vacinais.....	21
1.6 Resposta imune contra a infecção.....	24
2 Nanovacinas	27
2.1 Visão geral	27
2.2 Tipos de nanopartículas.....	29
2.2.1 Nanopartículas poliméricas	29
2.2.2 Nanopartículas inorgânicas.....	31
2.2.3 Lipossomas	31
2.2.4 <i>Virus like particles</i>	33
2.2.5 Complexos imunoestimulantes	34
2.2.6 Nanoemulsões	34
2.3 Toxicidade e segurança de nanopartículas	35
3 Proposta para construção de uma vacina de DNA contra o IBV encapsulada em nanopartículas de quitosana	37
3.1 Construção do plasmídeo de DNA.....	37
3.2 Preparação das nanopartículas de quitosana	38
3.3 Avaliação da nanopartícula.....	39
3.4 Toxicidade da partícula	40

3.5	Avaliação da resposta imune da ave	40
4	Conclusão	42
5	Referências	43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Ilustração de um pintinho apresentando sinais respiratórios.....	10
FIGURA 2 – Imagens de ovos apresentando defeitos de casca	11
FIGURA 3 – Esquema de partícula de IBV	12
FIGURA 4 – Comparação entre imagens de embriões.....	15
FIGURA 5 – Escala de comparação de NPs	28
FIGURA 6 – Estrutura básica de NPs poliméricas	30
FIGURA 7 – Estrutura de um lipossoma	32
FIGURA 8 – Estrutura de uma VLP	33
FIGURA 9 – Estrutura de um ISCOM	34
FIGURA 10 – Mapa do vetor pVax1™	38
FIGURA 11 – Fluxograma de fabricação da pS1IBV-Br-CS-NPs.....	39

RESUMO

A bronquite infecciosa das galinhas (BI) é uma doença viral aguda e altamente contagiosa, causada pelo vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV). É endêmica no Brasil sendo uma das principais doenças que geram perdas econômicas na indústria avícola, afetando tanto a produção de carne como a produção de ovos. O controle da BI é um desafio e como não existe tratamento, a vacinação é a estratégia mais eficiente para a prevenção da doença. Atualmente, a maior parte das vacinas para BI são vivas atenuadas ou inativadas, derivadas de sorotipos clássicos como p. ex. o *Massachusetts*. No entanto, acredita-se que hoje essas cepas geram baixa resposta imune nas aves de produção, especialmente quando se trata de desafios por variantes locais. A existência de vários sorotipos de IBV e vacinas que não oferecem proteção cruzada tornam o controle do IBV difícil. Esses fatos nos levam a pensar na importância do desenvolvimento de novas vacinas para variantes brasileiras. Tendo isso em mente, esse trabalho apresenta as características gerais do IBV e da BI, bem como diferentes tipos de adjuvantes de nova geração baseados em nanotecnologia e a produção de uma vacina de DNA encapsulada em nanopartículas de quitosana.

Palavras-chave: Nanopartículas, nanovacinas, vacina de DNA, quitosana.

ABSTRACT

Infectious bronchitis (IB) is an acute highly contagious viral disease caused by the avian infectious bronchitis virus (IBV). It is endemic in Brazil being one of the main diseases that generate economical losses in the poultry industry, affecting both meat and eggs production. The control of IB is a challenge and since there is no treatment, vaccination is the most effective strategy for disease prevention. Nowadays, most IB vaccines are live attenuated or inactivated derived from classical serotypes such as Massachusetts. However, it is believed that these strains generate low immune responses especially when dealing with challenges by local variants. The control of IBV is very difficult due to the existence of several IBV serotypes and vaccines that do not offer cross-protection. These facts lead us to think about the importance of the development of new vaccines made of Brazilian variants. Keeping this in mind, this work presents the general characteristics of IBV and IB as well as different types of new generation adjuvants based on nanotechnology as well as a proposal for the production of a DNA vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles.

Keywords: Nanoparticles, nanovaccine, DNA vaccine, chitosan.

1 Bronquite infecciosa das galinhas

1.1 Patogenia

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de carne de frango, atrás apenas dos Estados Unidos. De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, o Brasil produziu no ano de 2016 cerca de 13,6 milhões de toneladas, enquanto o líder norte americano produziu cerca de 18,3 milhões de toneladas (FRANCO, 2017). Dentre as diversas enfermidades aviárias, a bronquite infecciosa das galinhas (BI) é a segunda doença responsável por perdas econômicas na indústria avícola mundial (CEVAWORLD, 2016).

A BI é uma doença viral aguda e altamente contagiosa, causada pelo vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV) (JACKWOOD & DE WIT, 2013). Reconhecida desde 1931 como uma doença respiratória de aves jovens, pode ser definida como uma doença infectocontagiosa com manifestações respiratórias, renais, reprodutivas e entéricas de frangos, poedeiras e reprodutores (DI FÁBIO & VILLARREAL, 2012). É uma doença que gera altas perdas econômicas na indústria avícola, afetando tanto a produção de carne como a produção de ovos (CAVANAGH, 2007). No Brasil, é considerada uma doença endêmica (MONTASSIER, 2010).

Os diferentes tipos de IBV têm um amplo e variado tropismo e desta maneira a doença pode se apresentar de diversas formas clínicas (DI FÁBIO e VILLARREAL, 2012). É um vírus primariamente epiteliotrópico, replicando-se nas células epiteliais e secretoras de muco (MENDONÇA et al., 2009). Em aves jovens, o IBV causa principalmente uma doença do trato respiratório superior (Figura 1) e ainda redução no ganho de peso e menor eficiência alimentar dos animais (JACKWOOD & DE WIT, 2013). Caso a infecção não sofra complicações, os sinais clínicos tendem a desaparecer entre 10-15 dias (DI FÁBIO & VILLARREAL, 2012).



FIGURA 1 – Ilustração de um pintinho apresentando sinais respiratórios.
Fonte: COOK & JACKWOOD (2017).

São alterações patológicas comuns da BI em aves jovens edema e exsudato catarral ou mucoso na traqueia e brônquios, congestão pulmonar, inflamação catarral ou fibrinosa nos sacos aéreos, pericardite e pleurite. Além disso, pintos tendem a apresentar inflamação catarral nas vias aéreas e nos seios nasais, gerando descargas nasais e lacrimejamento. Eventualmente, a coagulação desse exsudato leva a produção de pus nos brônquios causando a morte do animal (DI FÁBIO & VILLARREAL, 2012).

A infecção por IBV predispõe os frangos a infecções bacterianas secundárias, como p. ex. *Mycoplasma gallisepticum* e *Escherichia coli*, que podem gerar aerossaculite, pericardite e peri-hepatite, levando à condenação de carcaças em abatedouros, aumentando ainda mais as perdas econômicas para a indústria (BALESTRIN et al., 2014).

Além das cepas com tropismo epitelial existem cepas nefropatogênicas do IBV. Essas cepas causam inicialmente um quadro respiratório seguido por sinais clínicos decorrentes de danos renais, como aumento no consumo de água e apresentação de fezes aquosas. A mortalidade nesses casos se inicia geralmente seis dias pós infecção, ocorrendo um pico próximo ao décimo dia e cessando por volta do 16º dia pós infecção. Os rins das aves doentes se apresentam aumentados, pálidos e com túbulos e ureteres distendidos com presença de uratos (DI FÁBIO & VILLARREAL, 2012).

Em poedeiras e reprodutoras, a infecção por IBV pode resultar em redução severa de até 70% da postura seguida de diminuição da qualidade interna

e da casca dos ovos (Figura 2). Poedeiras com ovos pigmentados podem passar a botar ovos pálidos com albúmen mais aquoso (JACKWOOD & DE WIT, 2013).

Como o vírus é capaz de se replicar no oviduto, a infecção de fêmeas em desenvolvimento, com até três semanas de idade, pode gerar lesões permanentes no trato reprodutivo dessas aves, resultando em baixa produção permanente ou levando ao desenvolvimento de falsas poedeiras (DI FÁBIO & VILLARREAL, 2012).

O IBV também já foi detectado em testículos de machos reprodutores, gerando queda severa de fertilidade (DI FÁBIO & VILLARREAL, 2012). Aves em postura não costumam apresentar sinais respiratórios, mas quando ocorrem, são sutis e possivelmente causados em decorrência de complicações bacterianas, sendo os sinais clínicos os mesmos de aves jovens (DI FÁBIO & VILLARREAL, 2012).

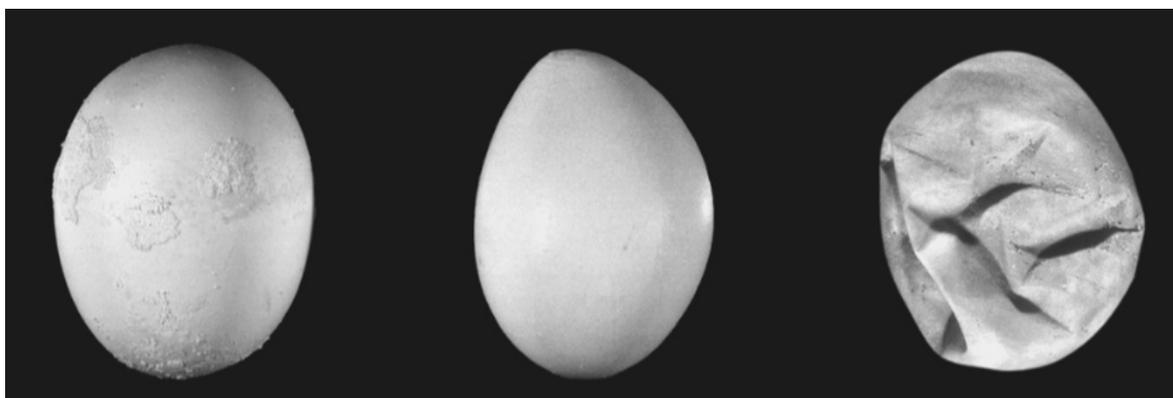


FIGURA 2 – Imagens de ovos apresentando defeitos de casca durante surto de BI. Fonte: JACKWOOD & DE WIT (2013).

1.2 Agente etiológico e suas características

O *Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas* (IBV) pertence a ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, subfamília *Coronavirinae* e gênero *Gammacoronavirus* (GROOT et al., 2008), podendo ser definido como um coronavírus de aves domésticas (*Gallus gallus*) (MONTASSIER, 2010). Os coronavírus estão divididos em três grupos: um, dois e três, sendo o IBV pertencente ao grupo três (CAVANAGH, 2007).

O IBV é um vírus envelopado e pleomórfico. Suas partículas virais apresentam cerca de 120 nm de diâmetro (JACKWOOD e DE WIT, 2013) e são formados por espículas (S), envelope (E), membrana (M) e proteínas estruturais do nucleocapsídeo (N) (Figura 3) (CAVANAGH, 2005).

A proteína S é a maior das proteínas estruturais dos coronavírus, apresentando protrusões de 16 - 21 nm que emergem da superfície dos vírions. Essas protrusões que dão ao vírus a aparência de “coroa” (corona) (WICKRAMASINGHE et al., 2014). A proteína S é dividida em duas subunidades, S1 e S2, com tamanho aproximado de 500 e 600 aminoácidos, respectivamente (CAVANAGH, 2007). Essa glicoproteína é responsável pela ligação dos vírions aos receptores celulares (S1) e pela fusão do envelope com a membrana plasmática (S2), liberando assim o genoma viral no citoplasma (CAVANAGH, 2007).

As proteínas estruturais S1 e N contém epítomos responsáveis pela geração de resposta imune no hospedeiro (BANDE et al., 2015). Na subunidade S1 da proteína S reside o principal sítio determinante da indução de anticorpos neutralizantes contra IBV, definindo assim o sorotipo do vírus (MENDONÇA et al., 2009; NICOLAS & BRITTON, 2013).

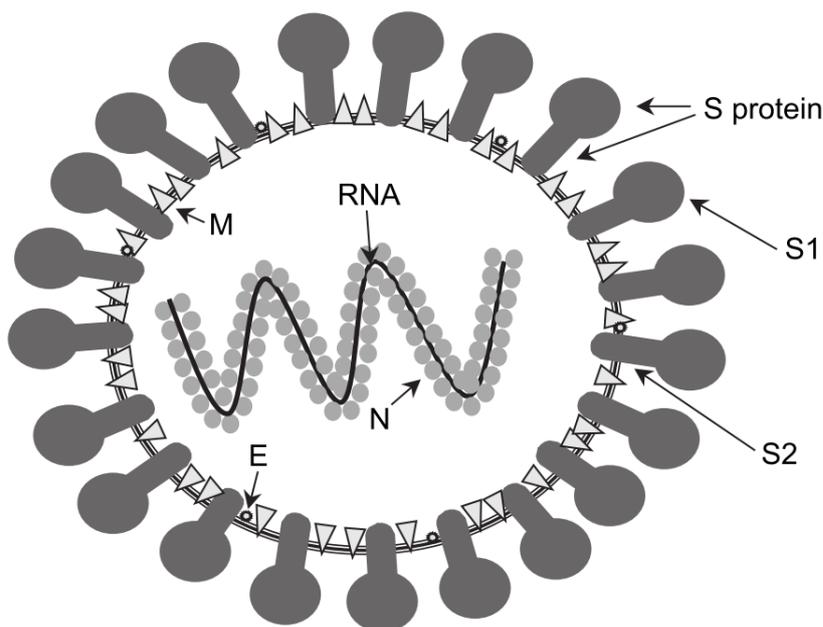


FIGURA 3 – Esquema de partícula de IBV apresentando envelope, suas quatro proteínas estruturais e genoma de RNA. A proteína N circunda o genoma enquanto as proteínas S, M e E estão ligadas ao envelope. Fonte: CAVANAGH (2005).

O mecanismo de replicação dos *Coronavirus* é complexo. O genoma codifica o complexo replicase, responsável pelo processo descontínuo de transcrição que leva à produção de seis RNAs mensageiros (mRNA) subgenômicos (LOVATO & DEZENGRINI, 2007; MENDONÇA et al., 2009), resultando em recombinações. Esse fato faz com que muitos vírus apresentem variações antigênicas, levando a existência de diversos sorotipos circulantes (LOVATO & DEZENGRINI, 2007).

Atualmente existem diversas cepas clássicas e variantes de IBV distribuídas mundialmente. Mutações podem ocorrer devido a variações na composição da proteína S1, podendo desta forma levar a alterações na proteção cruzada entre os sorotipos (BANDE et al., 2015). Esse fato torna importante o desenvolvimento de novas estratégias de controle.

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), recomenda que a escolha da estirpe vacinal deve estar relacionada com a distribuição geográfica do IBV no país, e isso é um grande desafio visto que novos sorotipos sempre surgirão em decorrência de mutações e recombinações virais (OIE, 2008).

1.3 Diagnóstico

O diagnóstico de BI requer o uso de testes laboratoriais, principalmente através da detecção viral acompanhada de testes sorológicos (DE WIT, 2000). As amostras devem ser preferivelmente obtidas imediatamente após o aparecimento dos sinais da doença, visto que a concentração de vírus é maior (NICOLAS & BRITTON, 2013). Após esse período, que dura entre três e cinco dias, o título viral cai rapidamente atingindo níveis não detectáveis (DE WIT, 2000). Na forma respiratória clássica, anticorpos começam a aparecer no soro dos animais infectados aproximadamente uma semana após a infecção (NICOLAS & BRITTON, 2013).

Para diagnóstico da forma respiratória da doença, *swabs* do trato respiratório superior, amostras da mucosa traqueal e pulmões devem ser coletados, bem como amostras sanguíneas. Para as demais formas de BI, em aves que apresentem nefrite ou redução da postura, devem ser coletadas amostras dos

rins e oviduto, além das amostras do trato respiratório e sangue. *Swabs* cloacais, tonsilas cecais e fezes também podem ser utilizadas, mas podem ser irrelevantes em casos mais avançados da doença (NICOLAS & BRITTON, 2013). Todas as cepas de IBV podem ser isoladas do trato respiratório (DE WIT, 2000).

Os testes laboratoriais que podem ser utilizadas na rotina diagnóstica são: isolamento viral, transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e teste de imunofluorescência. Sorologicamente, o IBV é detectado através de análises de soroconversão, utilizando soros que identificam as imunoglobulinas M e G específicas para IBV. Os testes sorológicos comumente utilizados são: inibição da hemaglutinação (HI) e ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (DE WIT, 2000).

1.3.1 Isolamento viral

Isolamento viral vem sendo considerado o padrão ouro para o diagnóstico do IBV, embora seja uma técnica bastante dispendiosa (BANDE et al., 2016). O IBV pode ser isolado a partir de diversos órgãos como: traqueia, pulmões, rins, proventrículo, tonsilas cecais e oviduto; ou ainda de *swabs* traqueais ou de orofaringe. Os sistemas biológicos utilizados para isolamento são: ovos embrionados *Specific Pathogens Free* (SPF), cultivo celular e cultivo de anéis de traqueia (TOC) de embriões SPF, sendo a cultivo celular pouco eficiente, portanto raramente utilizada (DE WIT, 2000; JACKWOOD & DE WIT, 2013).

Para obter sucesso no isolamento viral, a colheita das amostras deve ser feita utilizando técnicas apropriadas. Para isolamento a partir de *swabs*, deve-se armazenar o material em soluções tamponadas ou PBS antes do transporte. Tecidos devem ser coletados de maneira asséptica, apenas de aves eutanasiadas ou imediatamente após a morte (BANDE et al., 2016).

Para o transporte, as amostras de tecidos devem ser armazenadas em sacos plásticos estéreis e vedados, e serem mantidas no gelo até o processamento (BANDE et al., 2016). As amostras coletadas para o isolamento devem ser armazenadas a 4°C por no máximo 24 horas, no intuito de preservar a viabilidade

viral. Para armazenagem a longo prazo as amostras devem ser congeladas abaixo de -20°C o mais rápido possível (DE WIT, 2000).

Para isolar e identificar o IBV utilizando-se ovos SPF, inocula-se um macerado de órgãos na cavidade alantoide dos ovos embrionados com idade entre nove e onze dias de incubação (DI FÁBIO & VILLARREAL, 2012). Os ovos são incubados a $34-37^{\circ}\text{C}$ após a inoculação (BANDE et al., 2016). A maior parte dos IBV se desenvolvem bem quando inoculados em embriões dessa idade (BANDE et al., 2016). O pico de concentração de vírus no fluido alantoide ocorre nos dois primeiros dias após a inoculação nos ovos (DI FÁBIO & VILLARREAL, 2012), portanto, 48-72 horas após a inoculação o líquido alantoide deve ser coletado de ovos selecionados e testado para a presença do IBV, através de testes sorológicos ou RT-PCR (BANDE et al., 2016). O embrião é avaliado de cinco a sete dias após a inoculação em busca de alterações morfológicas (Figura 4) como: nanismo, enrolamento e depósito de urato nos mesonefrons e/ou mortalidade (DI FÁBIO & VILLARREAL, 2012). Vale ressaltar que esses sinais são sugestivos e não patognomônicos. Caso haja morte embrionária nas primeiras 24 horas pós inoculação, o resultado é considerado inespecífico (BANDE et al., 2016).



FIGURA 4 – Comparação entre imagens de embriões com 16 dias de idade. À esquerda temos a imagem de um embrião normal, enquanto à direita temos a imagem de um embrião infectado por IBV apresentando nanismo e enrolamento. Fonte: JACKWOOD & DE WIT (2013).

O isolamento viral a partir de cultivo de anéis de traqueia (TOC) de embriões SPF de 19-20 dias de idade é a técnica que melhor reproduz as condições *in vivo* (EPIPHANIO et al., 2002; MENDONÇA et al., 2009) além de ser um teste rápido e simples quando comparado ao isolamento utilizando embriões de ovos SPF. Os anéis traqueais são mantidos em garrafas para cultivo celular e infectados com amostras suspeitas para IBV (BANDE et al., 2016). O cultivo é observado sob microscópio de luz invertida, onde se verifica os batimentos ciliares na mucosa (EPIPHANIO et al., 2002). O resultado é positivo quando ocorre ciliostase. Esse método proporciona certa facilidade na titulação e sorotipificação viral, visto que nenhuma adaptação do vírus é necessária para sua realização (BANDE et al., 2016).

1.3.2 Diagnóstico sorológico

Inibição da hemaglutinação (HI) é um teste sorológico qualitativo utilizado para identificação e sorotipificação do IBV (BANDE et al., 2016). Para realização do HI, deve-se tratar previamente o vírus com a enzima fosfolipase C, para que haja a exposição das hemaglutininas, visto que o IBV não é naturalmente hemaglutinante (DI FÁBIO & VILLARREAL, 2012). Deve-se ressaltar que devido às diversas infecções e vacinações, os soros das aves podem conter anticorpos que apresentam reações cruzadas, questionando assim a confiabilidade desse teste. Portanto, o teste HI não apresenta alto grau de confiança (NICOLAS & BRITTON, 2013).

O ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) é um teste quantitativo e de fácil execução utilizado para acompanhamento sorológico de respostas vacinais e dos desafios de campo. É um indicador de imunidade humoral usado para detectar imunoglobulinas IgM e IgG, ainda na primeira semana pós-infecção ou vacinação (DI FÁBIO & VILLARREAL, 2012). Existem algumas variações de ELISA disponíveis para IBV, como p. ex. ELISA sanduíche, ELISA indireto e ELISA competitivo. Vírus neutralização (VN) ou teste de imunofluorescência também podem ser utilizados (NICOLAS & BRITTON, 2013).

Todos os testes sorológicos para o IBV devem ser cuidadosamente avaliados pois o uso extensivo de vacinas pode interferir nos resultados, já que por esses métodos os anticorpos vacinais não podem ser diferenciados dos gerados de fato durante a infecção (NICOLAS & BRITTON, 2013). O surgimento de diferentes sorotipos de IBV também é um fator limitante dos testes sorológicos. Sorotipos que não reagem com antissoros comumente disponíveis tornam os testes menos aplicáveis ou até mesmo inconclusivos na classificação de novos sorotipos (BANDE et al., 2016).

1.3.3 Diagnóstico molecular

A detecção molecular do IBV pode ser feita através de técnicas rápidas e de alta sensibilidade que permitem identificar a presença de todo ou apenas parte do genoma viral. Técnicas moleculares como transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), RT-PCR em tempo real (RT-qPCR), nested-RT-PCR, polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e sequenciamento genético são utilizadas para identificação genotípica de amostras ou de isolados virais (DI FÁBIO & VILLARREAL, 2012; BANDE et al., 2016).

A amplificação e o sequenciamento do gene da glicoproteína S1 utilizando RT-PCR é uma técnica bastante confiável para classificação genotípica de cepas de IBV (BANDE et al., 2016). O uso do RT-qPCR é interessante por ser capaz de quantificar a carga viral das amostras, bem como diferenciar cepas de campo, recombinantes e vacinais, através de análises da curva de *melting* (BANDE et al., 2016). O sequenciamento do gene S1 é realizado utilizando amplificação por RT-PCR e caracterização através de análises por bioinformática, baseada em sequências de referências em bancos de dados como o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

1.3.4 Diagnóstico diferencial

Várias doenças importantes podem ser confundidas com a BI, portanto a diferenciação rápida é imprescindível para eficiente ação e controle. Doenças respiratórias como doença de Newcastle (DN), laringotraqueíte infecciosa (LI), coriza infecciosa (CI) e influenza aviária (IA) podem causar inicialmente sinais clínicos similares aos da BI, no entanto, sinais neurológicos observados na DN, alta mortalidade vista na IA e cabeça inchada na CI, são sinais incomuns do IBV, sendo portanto úteis na diferenciação entre essas enfermidades (CALLISON et al., 2006).

1.4 Prevenção e controle

O controle da BI é um desafio na indústria avícola, principalmente devido ao aparecimento de sorotipos variantes e também pelo fato que diferentes tipos de vírus podem circular simultaneamente em uma mesma região (LIU et al., 2006). O controle da BI deve ter como base medidas de biossegurança, com rigoroso controle sanitário dos plantéis (MENDONÇA et al., 2009). De acordo com PENA et al. (2005), medidas básicas incluem:

- Isolamento de aves doentes
- Limpeza e desinfecção completa do aviário
- Utilização do sistema *all in all out*
- Manter lotes compostos apenas por aves da mesma idade
- Controle estrito do trânsito de veículos e de pessoas (exigindo banhos, trajes adequados e vazios sanitários)
- Monitoramento sanitário periódico dos lotes (usualmente através do teste ELISA)
- Diagnóstico rápido de infecções

Não existe tratamento específico para BI, porém algumas medidas podem ser tomadas na tentativa de reduzir perdas em um plantel acometido pela doença (JACKWOOD & DE WIT, 2013), como:

- Manutenção da temperatura do galpão

- Boa qualidade do ar
- Diminuição da densidade do aviário
- Diminuição da quantidade de proteína no alimento
- Suplemento eletrolítico na água de bebida

Devido ao alto poder de infecção do IBV, a resposta imune das aves se faz necessária visando a prevenção de diminuição de parâmetros zootécnicos (JACKWOOD & DE WIT, 2013). A utilização de vacinas, sejam elas vivas atenuadas ou inativadas, é uma prática comum utilizada para proteger principalmente poedeiras comerciais e aves de reprodução contra desafios de campo (CAVANAGH, 2007). Vacinas vivas atenuadas são capazes de gerar boa imunidade local no trato respiratório, produzindo proteção de mucosa, porém existe o risco de patogenicidade residual e reversão de virulência (BIJLENGA et al., 2004). As aves vacinadas ou as que se recuperaram de uma infecção se tornam protegidas contra infecções futuras decorrentes do mesmo vírus, entretanto a proteção desses animais contra diferentes sorotipos do IBV é bastante variável (JACKWOOD & DE WIT, 2013).

1.5 Vacinação

Como não existe tratamento para BI, a vacinação é a estratégia mais eficiente utilizada na redução das taxas de morbidade e mortalidade associadas a doença. Vacinas são utilizadas para estimular o sistema imune a iniciar uma resposta contra antígenos específicos (GILL, 2013), como p. ex. contra o IBV.

1.5.1 Histórico das vacinas

Na Holanda em 1956, foi diagnosticada pela primeira a BI no país. O diagnóstico foi feito através do isolamento viral, infecção experimental de galinhas e soro neutralização. Esse isolado viral (cepa H) foi então utilizado primeiramente para preparar uma vacina atenuada, através de 52 passagens seriadas em ovos

embrionados de galinha. A vacina recebeu então o nome “*IB vaccine strain H52*”, com via de administração oral através da água de bebida (BIJLENGA et al., 2004).

Através de testes de campo, constatou-se que a cepa H com 52 passagens era excessivamente virulenta para pintinhos, embora fosse eficiente para aves de postura. Desta forma, novas passagens foram necessárias para atenuar ainda mais o vírus. Foram feitas então 120 passagens, alcançando dessa forma um vírus menos virulento. Esse vírus passou então a ser conhecido como vacina H120 (BIJLENGA et al., 2004).

Por ser uma cepa menos virulenta, a vacina H120 tem sido utilizada há mais de 50 anos como vacina primária para frangos e também para primeira vacinação de aves reprodutoras e futuras poedeiras em todo o mundo (exceto na Austrália) (BIJLENGA et al., 2004). A cepa H de bronquite infecciosa foi uma das primeiras vacinas atenuadas desenvolvida para BI. Esse é o exemplo do desenvolvimento de uma vacina com grande importância na avicultura industrial brasileira e mundial. A H120 foi possivelmente a vacina mais utilizada mundialmente devido à sua capacidade de promover proteção cruzada contra diferentes sorotipos do IBV.

Atualmente, a maior parte das vacinas para BI são vacinas vivas atenuadas ou inativadas, derivadas de sorotipos clássicos ou variantes. Essas vacinas são desenvolvidas a partir de variantes originadas dos EUA, como p. ex. M41, Ma5, Ark; da Holanda, como a H52 e H120; e ainda a partir de outras cepas europeias como 793/B, CR88 e D274; entre outras (BANDE et al., 2015).

No Brasil, a BI foi diagnosticada pela primeira vez em 1957, no estado de Minas gerais e a vacinação contra o IBV iniciou-se no país em 1980 com vacinas vivas atenuadas ou inativadas (CEVAWORLD, 2016; MONTASSIER, 2010). Em 1979, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) aprovou o uso de vacinas vivas H120 e H52 do sorotipo *Massachusetts* (MONTASSIER, 2010). Recentemente, a empresa Ceva lançou no Brasil a vacina Cevac IBras L, a primeira vacina viva contra a bronquite variante brasileira (“CEVA SAÚDE ANIMAL”, 2016).

Embora vacinas provenientes do sorotipo *Massachusetts* sejam amplamente utilizadas e apresentaram bons resultados no período inicial de utilização no Brasil, acredita-se que hoje essas cepas geram baixa resposta imune nas aves de produção, especialmente quando se trata de variantes locais

(MONTASSIER, 2010; BANDE et al., 2015). Além do mais, vacinas vivas atenuadas podem contribuir na emergência de novas variantes patogênicas de IBV (BANDE et al., 2015).

Segundo MONTASSIER (2010), uma variante brasileira do IBV tem circulado e evoluído no campo desde 1988, e essa pode ser a causa de surtos recorrentes da doença no país. A existência de vários sorotipos de IBV e vacinas que não oferecem proteção cruzada tornam o controle do IBV muito difícil. Embora a mortalidade decorrente da BI é de aproximadamente 5%, algumas cepas podem causar nefrite nos animais atingindo taxas de 50% a 80% (SMITH et al., 2015). Esses fatos nos levam a pensar na importância do desenvolvimento de novas vacinas específicas, preferivelmente inativadas, contra variantes brasileiras e que gerem uma resposta imune adequada, diminuindo assim as perdas econômicas decorrentes da BI no país.

1.5.2 Programas vacinais

Devido à grande variedade de sorotipos de IBV, não é possível aplicar uma regra geral, portanto cada programa deve ser adaptado de acordo com a exigência de campo de cada região.

Vacinas vivas são aplicadas via spray (partículas grossas) ou na água de bebida, enquanto vacinas inativadas devem ser aplicadas individualmente e permitem a combinação de outros antígenos além do IBV. Para que o potencial de vacinas inativadas seja máximo, as aves devem ser primeiramente vacinadas com vacinas vivas, sendo a vacina inativada utilizada como dose de reforço. Deve-se respeitar o intervalo de quatro a seis semanas entre as duas vacinações (COOK & JACKWOOD, 2017).

Com o objetivo de fornecer proteção eficiente contra o IBV durante toda a vida do animal, bem como reduzir perdas econômicas decorrentes de sua infecção, as aves são vacinadas no primeiro dia de vida. Em poedeiras e reprodutoras, o programa vacinal tem por objetivo proteger o oviduto durante toda a vida da ave, utilizando-se, portanto, inicialmente uma vacina viva atenuada e

posteriormente uma vacina inativada, garantindo assim proteção mais ampla e duradoura (COOK & JACKWOOD, 2017).

A proteína S induz tanto resposta imune celular quanto humoral em aves infectadas por IBV (CAVANAGH, 2007). Anticorpos não estão diretamente ligados a proteção contra o vírus e linfócitos T citotóxicos são indispensáveis no combate à doença (COOK et al., 2012; OKINO et al., 2017).

Atualmente, diversas estratégias estão sendo estudadas na tentativa de gerar resposta imune e proteção contra o IBV em aves. Essas estratégias podem ser baseadas p. ex. no uso de vacinas vivas atenuadas e vacinas baseadas em plasmídeos de DNA e IBVs recombinantes (WICKRAMASINGHE et al., 2014), sendo a maior parte das vacinas disponíveis atualmente no mercado do tipo vivas atenuadas (DE WIT et al., 2011).

1.5.2.1 Tipos de vacina contra o IBV

Como dito anteriormente, vacinas inativadas são utilizadas, mas embora sejam capazes de induzir altos níveis de anticorpos não são capazes de gerar altas respostas imunes celulares, resultando em menos de 50% de proteção para as aves quando utilizadas sozinhas (GUO et al., 2010). Assim, é visível a necessidade do desenvolvimento de vacinas mais seguras e eficientes contra o IBV.

Vacinas vivas atenuadas são atualmente o padrão ouro na proteção das aves contra o IBV, gerando alta resposta imune. São obtidas a partir de passagens seriadas de isolados de IBV em ovos embrionados e constitui a vacina mais comercializada atualmente contra o esse vírus (WICKRAMASINGHE et al., 2014).

A atenuação é baseada na adaptação de um isolado de campo virulento a embriões de aves, com o objetivo de gerar vírus com virulência reduzida, mantendo sua capacidade de induzir resposta imune suficiente frente a um desafio. As cepas virais atenuadas apresentam a maior parte das mutações na proteína S e nas regiões que codificam as proteínas de replicação. Não é possível prever por técnicas baseadas em genética se o IBV está suficientemente atenuado ou ainda se é capaz de gerar resposta imune eficaz durante o processo de atenuação (WICKRAMASINGHE et al., 2014).

Vacinas atenuadas podem oferecer risco de patogenicidade residual associada à reversão de virulência da cepa nas aves (NICOLAS & BRITTON, 2013), levando à disseminação do vírus vacinal (GUO et al., 2010).

As Vacinas de DNA, gênicas ou de terceira geração consistem em uma nova estratégia utilizada na imunização onde se utiliza apenas a informação genética do patógeno. Esse fragmento genético é então responsável pela codificação de proteínas que caracterizem antígenos expressivos para a geração de resposta imune (DINIZ; FERREIRA, 2010).

Esse conceito vacinal surgiu a partir da observação que animais inoculados com plasmídeos transportando genes expressos a partir de células transfectadas, células cujo DNA transferido tem a capacidade de usar o maquinário enzimático fundamental à transcrição e tradução, geram antígenos capazes de desencadear as respostas imunológicas necessárias para proteção contra patógenos (DINIZ; FERREIRA, 2010).

As vacinas de DNA utilizam recursos biológicos baseados em DNA recombinante, sendo a informação genética encarregada pela codificação de antígenos com propósito vacinal clonada e propagada em linhagens de *Escherichia coli* (DINIZ & FERREIRA, 2010).

De acordo com KANO et al. (2007), o sucesso da imunização com DNA depende, principalmente, da natureza dos antígenos, da frequência e via de administração, da concentração de DNA administrada, da localização celular do antígeno codificado pelo plasmídeo (secretado, ligado à membrana ou citoplasmático), da idade e saúde do hospedeiro e da espécie dos animais vacinados. No entanto, estudos clínicos mostram que de maneira geral a magnitude da resposta imune a esse tipo de vacina é geralmente baixa, e diretamente ligada a quantidade de plasmídeo administrado (ZHAO et al., 2014a).

Estratégias buscando melhorar a eficácia dessas vacinas vêm sendo propostas como: otimização dos plasmídeos, melhoria nos mecanismos de entrega, uso de diferentes rotas de imunização e principalmente uso de adjuvantes e carreadores mais potentes para aumentar a imunogenicidade (ZHAO et al., 2014a).

Dentre os sistemas de entrega de antígenos, NPs preparadas a partir de biomateriais (p. ex. quitosana) podem oferecer diversas vantagens como: proteger

o plasmídeo contra a degradação *in vivo*, limitar a distribuição sistêmica consequentemente reduzindo a dose e possíveis efeitos adversos (ZHAO et al., 2014a).

Tratando-se de IBV, essas vacinas são capazes de induzir eficientemente tanto imunidade celular como humoral. A subunidade S1 da proteína S é necessária e suficiente na indução de imunidade, e já foi utilizada com sucesso em vacinas desse tipo (YANG et al., 2009).

Outro tipo de vacina são as vacinas recombinantes. Essas vacinas são produzidas com base em vírus geneticamente manipulados, os quais integram material genético de outros vírus. Os vírus mais usados para a construção desse tipo de vacina são os que apresentam genomas grandes (GOMES, 2014).

O processo se inicia com a deleção dos genes que não são essenciais para a replicação viral. Em seguida, são inseridos os genes do vírus de interesse. Isso resulta em um vírus recombinante, que codifica os antígenos determinados, induzindo resposta imune (GOMES, 2014).

Estudos que testaram a capacidade de vírus recombinantes protegerem as aves em desafios *in vivo* demonstraram a importância do gene da proteína S na atenuação e indução de resposta imune. Vacinação com IBV recombinante *Beaudette* com espículas do vírus M41 se mostrou eficiente na proteção contra desafio com IBV M41, confirmando a importância da proteína S na indução de resposta imune efetiva (WICKRAMASINGHE et al., 2014).

1.6 Resposta imune contra a infecção

Apesar do grande número de estudos relacionados a cepas e variantes do IBV nos últimos anos, estes se limitam geralmente a classificação e diferenciação do vírus em genótipos e sorotipos enquanto o mecanismo imune específico envolvido na patogenia do vírus permanece pouco elucidado (OKINO et al., 2017). A resposta imune humoral à vacinação sempre foi a mais estudada através da avaliação de níveis de anticorpos no soro, lágrima e traqueia através de ELISA, HI ou VN (CAVANAGH, 2007). Sabe-se que tanto a resposta humoral

quanto a celular são importantes no controle de infecções, e com o IBV não seria diferente (CARON, 2010).

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa do organismo na presença de infecções (OKINO et al., 2017). Durante a infecção primária, a resposta imune inata é induzida na mucosa da traqueia quando os vírions do IBV se ligam a receptores do epitélio, dando início a infecção (KJÆRUP et al., 2014). Diversas células imunes e não imunes da mucosa estão envolvidas no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Os PAMPs são identificados através de receptores de reconhecimentos de padrões (PRRs), sendo os receptores *tool-like* (TLR) importantes (OKINO et al., 2017).

Durante a infecção de um vírus de RNA, a ativação do sistema imune inato depende da interação de receptores associados ao endossomo, como TLR3 e TLR7 e/ou receptores PRRs citosólicos, como o receptor tipo RIG-I. TLR3 e TLR7 atuam respectivamente em RNA de fita dupla e RNA de fita simples, sendo a via de ativação para ação desses receptores mediada por TRIF (domínio TIR contendo adaptador indutor de IFN- β) e MyD88 (gene 88 de resposta primária de diferenciação mielóide). Essa via leva a produção de Interferon tipo I (IFN α e IFN β), com ação antiviral e também de citocinas pro-inflamatórias (IL1 β e IL6) (KAMEKA et al., 2014).

Durante o desenvolvimento da imunidade adaptativa contra o IBV, imunidade mediada por células (CMI) está associada a células T citotóxicas (CTLs) CD3+, CD8+ e CD4+. Além disso, CD8+ e outros genes relacionados a CMI se mostram aumentados durante respostas secundárias ao IBV, estando assim relacionados a memória induzida em decorrência de uma primeira exposição ao IBV. Aumento no número de macrófagos infiltrados nos pulmões e traqueia é observado imediatamente após a infecção do IBV (KAMEKA et al., 2014).

A resposta humoral sistêmica anti-IBV apresenta uma baixa correlação com proteção contra a infecção pelo vírus (CAVANAGH, 2007; COOK et al., 2012). No entanto, anticorpos IgA (Imunoglobulina A), anti-IBV, de secreções mucosas se mostram importantes na defesa do organismo em reinfecções. Anticorpos IgG localmente produzidos após uma segunda infecção também são capazes de neutralizar o vírus, porém a resposta humoral varia de acordo com a carga vacinal ou intensidade da infecção primária (OKINO et al., 2013). Enquanto a IgG se mostra

elevada até 21 dias após uma infecção por IBV, a IgM é transitória atingindo seu pico oito dias após a infecção, diminuindo gradativamente.

Acredita-se que a resposta humoral, portanto, não está diretamente ligada à resistência das aves ao IBV (COOK et al. 2012). Para que as aves tenham uma proteção eficiente e duradoura contra a infecção por IBV, logo, é necessária a ativação em conjunto do sistema imune celular (células de memória) e humoral contra o vírus, bem como apresentação de resposta local e sistêmica (CHHABRA et al., 2015).

2 Nanovacinas

2.1 Visão geral

Nano é uma palavra originada do grego, “anão”, sendo utilizada hoje com o significado de bilionésima parte, e combinada a um substantivo para formar palavras como: nanômetro, nanotecnologia e nanovacina.

A origem do conceito de nanotecnologia é de 1959, quando o físico Richard Feynman, ganhador do Prêmio Nobel de Física, na Sociedade Americana de Física, descreveu máquinas moleculares construídas com precisão atômica em sua palestra *There's plenty of room at the bottom*. Porém o termo nanotecnologia foi primeiramente utilizado apenas no ano de 1974, pelo Professor Noro Taniguchi (IRACHE et al., 2011) e posteriormente popularizado por K. Eric Drexler nos anos 1980 (MUKTAR et al., 2015).

Nanotecnologia pode ser definida como: ciência e engenharia de estruturas ordenadas com diâmetro menor que um micrômetro (Figura 5) (BRIGGER et al., 2002). É a arte de manipular a matéria átomo a átomo (VIKRAMA CHAKRAVARTHI & BALAJI, 2010). Uma nanopartícula (NP) consiste em qualquer material particulado com tamanho menor que 1 μm (ZHAO et al., 2014b).

A nanotecnologia permite o desenvolvimento de nanopartículas (NPs) de diversas composições, tamanhos, formas e propriedades (ZHAO et al., 2014b) aplicáveis tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária. Essas partículas podem ser utilizadas na nanovaciniologia tanto como um sistema de entrega (*delivery system*), melhorando o processamento dos antígenos, como um adjuvante imunoestimulante, capaz de ativar e/ou melhorar a resposta imune (ZHAO et al., 2014b).

NPs utilizadas como adjuvantes na medicina veterinária devem ser baratas, estáveis, de fácil administração e biodegradáveis para as espécies cuja carne é utilizada para consumo humano (UNDERWOOD & VAN EPS, 2012). A nanovaciniologia profilática é aplicada para a prevenção de diversas doenças, enquanto a nanovaciniologia terapêutica é mais comumente aplicada para

tratamento humano de câncer e outras doenças como hipertensão e doença de Alzheimer (ZHAO et al., 2014b).

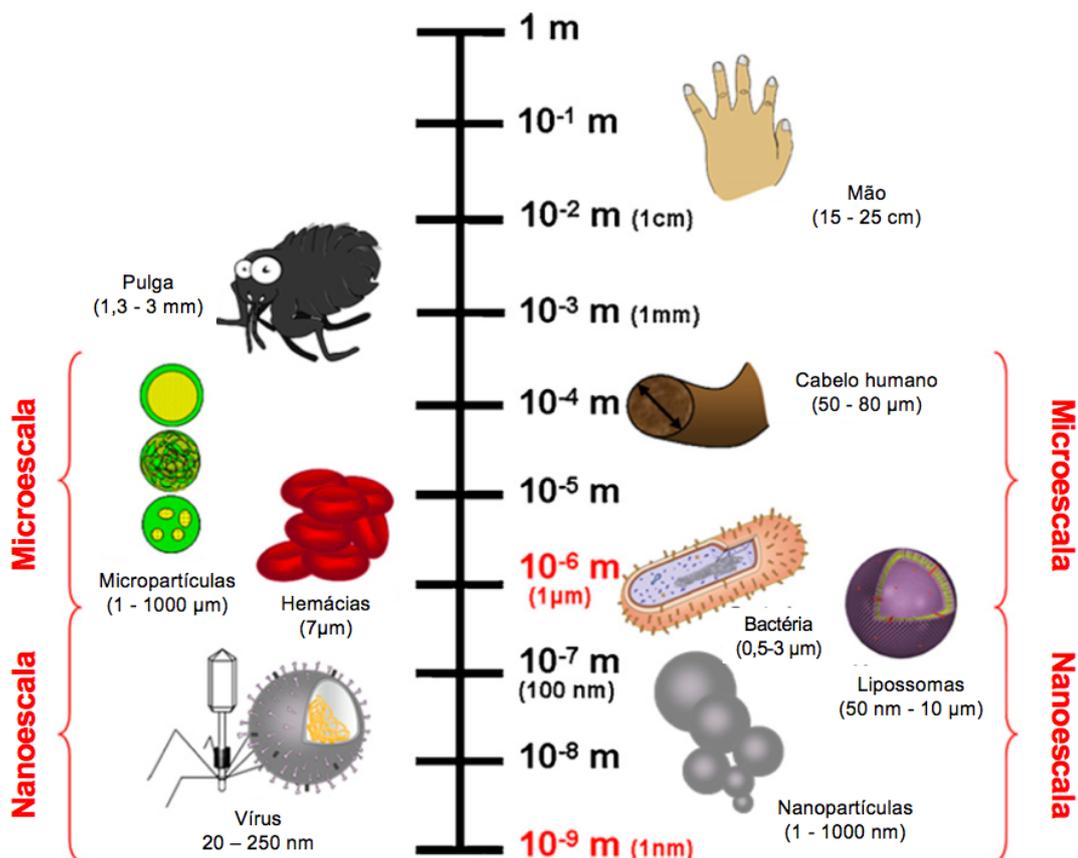


FIGURA 5 – Escala de comparação de NPs com alguns componentes biológicos. Fonte: Adaptado de IRACHE et al. (2011).

Vacinas formuladas para promover resposta humoral duradoura e eficiente contra patógenos são compostas principalmente por antígeno inativados ou atenuados e um adjuvante (UNDERWOOD & VAN EPS, 2012). Porém, algumas formulações vacinais apresentam características pouco imunogênicas e alta sensibilidade à degradação pelo organismo, se fazendo, portanto, necessário o uso de adjuvantes otimizados, capazes de melhorar a imunogenicidade das formulações (NORDLY et al., 2009).

Adjuvantes convencionais não são moléculas ajustáveis, sendo, portanto, limitados. Com o desenvolvimento da nanotecnologia, grande variedade de novos carreadores de antígenos se tornaram disponíveis (UNDERWOOD & VAN EPS, 2012). Esses novos adjuvantes/nanocarreadores, se mostram altamente

ajustáveis, proporcionando construções de formulações com doses reduzidas, vias de aplicação variáveis e direcionadas para respostas específicas (SCHEERLINCK & GREENWOOD, 2006).

As vacinas de nova geração, também chamadas vacinas de subunidades, consistem em vacinas baseadas em proteínas, peptídeos sintéticos e/ou plasmídeos de DNA (ácido desoxirribonucleico). Embora essa nova geração de vacinas ofereça vantagens como baixa toxicidade quando comparada a vacinas tradicionais, elas apresentam baixa capacidade imunogênica quando administradas sozinhas. Tendo isso em mente, a produção dessas vacinas exige o uso de adjuvantes apropriados para proteger e potencializar esses imunógenos e consequentemente desencadear resposta imune eficiente (IRACHE et al., 2011).

A nanotecnologia oferece alternativas para a produção de novos adjuvantes capazes de encapsular e/ou carrear proteínas, peptídeos e DNA de antígenos, juntamente com outros componentes imunoestimulantes, sendo esses mais eficientes, seguros e de fácil administração quando comparado aos adjuvantes tradicionais (IRACHE et al., 2011; MAMO & POLAND, 2012). Além disso, a conjugação de antígenos em NPs permite a apresentação do imunógeno para o sistema imune de uma forma muito parecida a que o patógeno seria apresentado, provocando, portanto, resposta similar (GREGORY et al., 2013).

Novos adjuvantes baseados em NPs se mostram viáveis para administração via mucosa. Esse fato se mostra altamente relevante quando se observa que grande parte das infecções ocorrem a partir da superfície mucosa respiratória, gastrointestinal e urogenital, sendo a proteção nesse nível, portanto, essencial (IRACHE et al., 2011).

2.2 Tipos de nanopartículas

2.2.1 Nanopartículas poliméricas

Uma grande variedade de polímeros sintéticos e naturais são utilizados na preparação de NPs poliméricas adjuvantes (Figura 6) (IRACHE et al., 2011).

Dentre os polímeros sintéticos se destacam o *poly(d,l-lactide-co-glycolide)* (PLG) e o *poly(d,l-lactic-coglycolic acid)* (PLGA), pois são moléculas que apresentam excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade. Esses dois polímeros aprisionam o antígeno para serem entregues apenas para certas células e regulam a liberação do mesmo devido a sua lenta biodegradação (IRACHE et al., 2011). Como exemplos de polímeros naturais temos: pululano, alginato, quitosana e inulina, sendo a quitosana a mais amplamente estudada (ZHAO et al., 2014b).

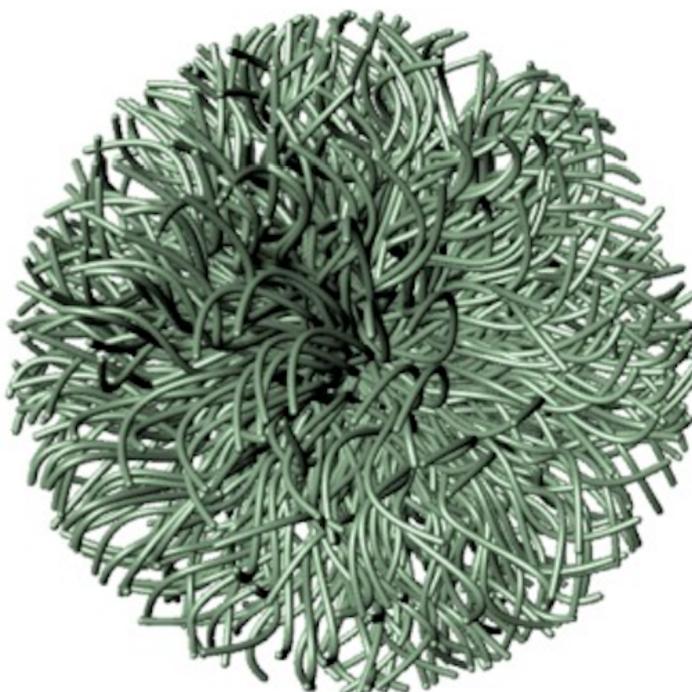


FIGURA 6 – Imagem representando a estrutura básica de NPs poliméricas onde antígenos podem ser dissolvidos, encapsulados ou conjugados à superfície.
Fonte: SANNA et al. (2014).

A quitosana é um polissacarídeo catiônico produzido através da N-deacetilação parcial da quitina - polissacarídeo encontrado no exoesqueleto de crustáceos. É um polímero altamente utilizado para a preparação de NPs devido a características ideais como alta biocompatibilidade, biodegradação boa capacidade imunestimulante e não-toxicidade. Além disso, apresenta ótimas propriedades bioadesivas e habilidade de melhorar a penetração de moléculas através da mucosa (IRACHE et al., 2011). Essas partículas apresentam de 100 - 250 nm de diâmetro e são capazes de proteger o DNA da degradação por nucleases (GREGORY et al., 2013).

As NPs poliméricas são preparadas através da combinação da substância desejada (p. ex. plasmídeo de DNA ou vírus inativado) com o polímero. Os componentes são dissolvidos, aprisionados ou adsorvidos à superfície da NP do polímero. Essas NPs variam sua forma de nanoesféras a dendrímeros e apresentam características, propriedades de superfície, morfologia e composição altamente ajustáveis que permitem assim adaptações para otimizar o objetivo desejado (p. ex. biocompatibilidade e degradação) (UNDERWOOD & VAN EPS, 2012).

2.2.2 Nanopartículas inorgânicas

NPs inorgânicas são partículas com grande potencial carreador, utilizadas tanto para fins terapêuticos como vacinais. No entanto, a aplicação desses nanocarreadores é limitada devido ao baixo potencial de biodegradação, toxicidade e acúmulo em tecidos (UNDERWOOD & VAN EPS, 2012). Essas NPs, porém, têm como vantagem a apresentação de uma estrutura rígida e de síntese controlada. Exemplos de partículas bastante estudadas são: NPs de ouro (AuNPs), NPs de carbono, NPs de fosfato de cálcio e NPs de sílica (SiNPs) (ZHAO et al., 2014b).

2.2.3 Lipossomas

Lipossomas ou nanocápsulas lipídicas (Figura 7) são vesículas com tamanho entre 20 e 100 nm (IRACHE et al., 2011) formadas por bicamadas de fosfolípidios não tóxicos e biodegradáveis e um núcleo aquoso, sendo capazes de encapsular e entregar tanto moléculas hidrofílicas quanto hidrofóbicas (KIM et al., 2014).

Essas partículas podem ser geradas tanto por uma como por várias bicamadas lipídicas separadas por camadas aquosas (GREGORY et al., 2013). Essa propriedade permite que lipossomas sejam capazes de carrear simultaneamente antígenos e outras moléculas, como por exemplo, antígenos

combinados com adjuvantes. As capacidades físico-químicas dos lipossomas, incluindo tamanho, composição e estrutura, podem ser facilmente moduladas de acordo com a necessidade do antígeno, na tentativa de maximizar a imunogenicidade da partícula (KIM et al., 2014).

Lipossomas com modificações de superfície são desenvolvidos, por exemplo, para que tenham células imunes como alvo específico, podendo carrear simultaneamente agentes imunoestimulantes aumentando assim tanto a resposta humoral quanto a resposta celular, melhorando, portanto, a eficácia das vacinas lipossomais (KIM et al., 2014).

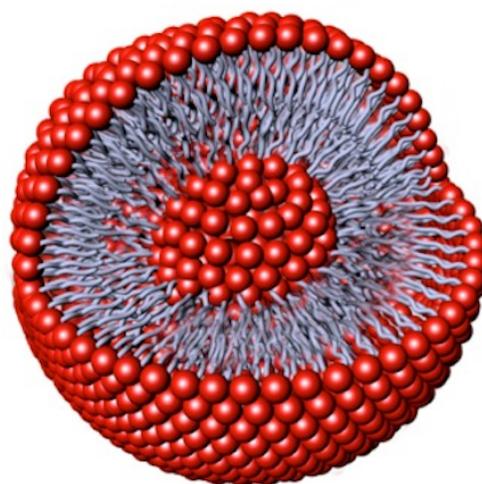


FIGURA 7 – Imagem de um lipossoma apresentando estrutura composta por bicamada fosfolipídica com grupos hidrofílicos e hidrofóbicos automontantes em água.

Fonte: SANNA et al. (2014).

Diversas vias de administração podem ser utilizadas para os lipossomas, incluindo a via intramuscular (IM), intravenosa (IV) e também uso tópico. No entanto, são altamente susceptíveis a degradação pelo trato intestinal, não sendo, portanto, utilizados via oral. Essas NPs apresentam longa vida de prateleira e podem apresentar valores acessíveis, sendo assim uma opção para uso na medicina veterinária. Além disso, são biodegradáveis e apresentam baixa toxicidade, porém reações de hipersensibilidade mediadas pelo sistema complemento podem ocorrer em resposta à administração IV (UNDERWOOD & VAN EPS, 2012).

2.2.4 Virus like particles

Virus like particles (VLPs) são partículas automontantes, não patogênicas e não replicantes com tamanho e conformação similares a vírions intactos (Figura 8) (XIANG et al., 2006).

VLPs são compostas por uma ou várias proteínas virais expressadas *in vitro* através de tecnologias de recombinação, formando partículas de 20 -100 nm (SCHEERLINCK e GREENWOOD, 2008). São NPs utilizadas tanto como carreadores como adjuvantes de antígenos *in vivo* (XIANG et al., 2006).

Essas partículas apresentam a capacidade de ativar células B e gerar a produção de altos níveis de anticorpos, sem contar que seu tamanho nanométrico possibilita seu fácil reconhecimento pelas células apresentadoras de antígenos e sua degradação, levando à ativação das células T. VLPs são capazes de induzir forte resposta humoral e celular, mesmo na ausência de adjuvantes (ZELTINS, 2013).

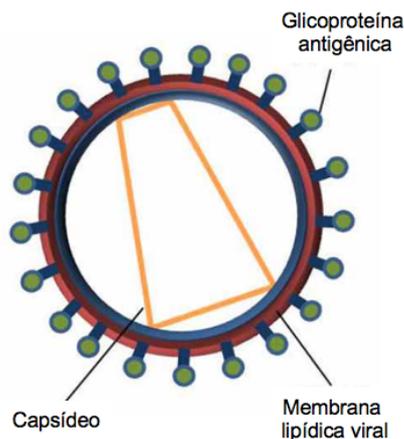


FIGURA 8 – Estrutura de uma VLP apresentando capsídeo, membrana lipídica viral e glicoproteína antigênica.
Fonte: GREGORY et al. (2013).

2.2.5 Complexos imunoestimulantes

Complexos imunoestimulantes (ISCOM), são veículos de entrega de antígenos (Figura 9) com alto poder adjuvante. Essas NPs possuem aproximadamente 40 nm e são produzidas através da combinação de proteínas de antígenos, colesterol, fosfolipídios e QuilA (adjuvante de saponina derivado da planta *Quillaia saponaria*). São partículas “tipo-jaula” que aprisionam as proteínas de antígenos (geralmente proteínas de membrana hidrofóbica) no seu interior através de interações apolares (PEEK et al., 2008).



FIGURA 9 – Estrutura de um ISCOM. O antígeno é “aprisionado” no interior do espaço representado por pentágonos.
Fonte: GREGORY et al. (2013).

2.2.6 Nanoemulsões

Emulsões vacinais foram inicialmente descritas por Le Moignic e Pinoy em 1916. A emulsão água-em-óleo (W/O) de Freund sempre foi considerada bastante instável e viscosa, causando fortes reações locais, mas ainda assim se mostrava bem eficiente na indução de resposta imune até mesmo quando se tratava de antígenos fracos (XIANG et al., 2006).

O emulsificante MF59, produzido pela *Chiron Corporation*, é considerado extremamente estável e pode ser utilizado para gerar nanoemulsões óleo-em-água (O/W), com partículas de 200 - 300 nm. Essas partículas apresentam características como baixa viscosidade e alta biodegradabilidade, sendo capazes

de ativar o sistema imune sem a presença de antígenos. Além do mais, essa emulsão é aplicável para vacinas de DNA (XIANG et al., 2006).

As vantagens das nanoemulsões incluem simplicidade, baixo custo, alta estabilidade e habilidade de proteção à degradação. Essas NPs são versáteis e podem ser preparadas a partir de diversas soluções aquosas, surfactantes e óleos. No entanto, esse tipo de NP é considerado recente, devendo ser utilizado, portanto, com cuidado até que seu comportamento físico-químico seja completamente elucidado. Além disso, altas concentrações de solventes e surfactantes nas formulações podem ser tóxicos para os tecidos onde são aplicados ou que se acumulam, resultando em hemólise, dano celular e inflamação tecidual indesejada (UNDERWOOD & VAN EPS, 2012).

2.3 Toxicidade e segurança de nanopartículas

As NPs apresentam propriedades físico-químicas únicas que viabilizam seu uso com diversos benefícios, porém suas aplicações também podem resultar em efeitos adversos. Tendo isso em mente, uma avaliação rigorosa dos efeitos e implicações dessas partículas deve ser feita (O'BRIEN & CUMMINS, 2010). Essas análises devem ser executadas não apenas para o animal que está recebendo as NPs, mas também para pessoas em contato com eles, ambiente em que vivem e ainda existência de resíduos na produção de alimentos (UNDERWOOD & VAN EPS, 2012).

O potencial de toxicidade das NPs é afetado por vários fatores, como: composição química, carga, tamanho e formato (CARD et al., 2011). Partículas não-biodegradáveis, como as NPs inorgânicas, são mais comumente associadas a efeitos adversos, além de apresentarem maior característica de acúmulo tecidual quando comparadas às NPs biodegradáveis (UNDERWOOD & VAN EPS, 2012).

A avaliação da segurança de NPs requer a combinação de testes *in vivo* e *in vitro*. Primeiramente, a avaliação *in vitro* da citotoxicidade, genotoxicidade e influência da NP em sinalização e outras funções celulares é fundamental. Esses testes podem ser executados através de modelos de cultivo celular e expressão gênica, utilizando preferivelmente diversos tipos celulares (SCHRAND et al., 2010).

Comumente, as NPs com efeitos tóxicos podem causar danos diretos no DNA, resultando em mutagêneses com alto potencial carcinogênico, além de danos oxidativos, interações com proteínas e enzimas, apoptose celular, aumento na expressão de genes inflamatórios, dano mitocondrial e rompimento do citoesqueleto e matriz celular (ZHAO & CASTRANOVA, 2011).

Embora a experimentação *in vitro* auxilie bastante no entendimento da toxicidade de NPs, nem sempre resultados de experimentos *in vitro* se comportam da mesma forma quando aplicados *in vivo*. Desta forma, a experimentação *in vivo* se mostra indispensável para avaliação de efeitos adversos, bem como biodistribuição de NPs (UNDERWOOD & VAN EPS, 2012).

A absorção, distribuição, metabolismo, acúmulo e excreção de NPs devem ser definidas por estudos de farmacocinética e toxicocinética, considerando suas interações com fluidos corporais, células e tecidos. Efeitos como hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, anafilaxia, inflamação, formação de granulomas e acúmulo tecidual de partículas em tecidos são ocorrências de grande interesse, principalmente se tratando de animais de produção, onde existe alto potencial para contaminação ambiental (KIM, 2005; SZEBENI et al., 2007).

Além dos efeitos diretos que podem ser causados pelo uso de NPs em animais, seu uso comercial e aplicações industriais podem resultar em acúmulo desses materiais no meio ambiente. Esse fato pode ter um impacto significativo em diversas espécies de produção, como p. ex. para os peixes (O'BRIEN & CUMMINS, 2010).

Na tentativa de regular os impactos ao meio ambiente e aumentar a segurança no uso de NPs, bancos de dados foram criados para passar informações sobre esses materiais. Exemplos de bancos são: *EU Nanoforum*, *Nano Health Environment Commented Database*, *The Good Nano Guide* e *Nanowerk* (UNDERWOOD & VAN EPS, 2012).

3 Proposta para construção de uma vacina de DNA contra o IBV encapsulada em nanopartículas de quitosana

Sabendo do potencial da proteína S em gerar resposta no organismo das aves, vacinas baseadas na proteína S1 podem ser vantajosas na prevenção da BI. No entanto, como dito anteriormente, essas vacinas necessitam de adjuvantes/carreadores potentes para serem viáveis e gerarem resposta imune suficiente para proteger o organismo das aves.

Dentre os diversos nanomateriais disponíveis para serem utilizados como adjuvantes de nova geração, a quitosana apresenta grande potencial para ser utilizado como carreador e adjuvante das vacinas de DNA. Desta forma, propomos a construção de uma vacina de DNA utilizando o gene S1 de uma variante brasileira do IBV para ser administrada via óculo-nasal (mucosa).

3.1 Construção do plasmídio de DNA

A clonagem e o sequenciamento são necessários para construção da vacina de DNA. A amplificação do gene da glicoproteína S1 a partir do genoma de RNA viral de um IBV isolado de campo, ou IBV brasileiro já sequenciado obtido do *GenBank*, deve ser feita por RT-PCR e clonado (utilizando *kits* de clonagem) no vetor de expressão pVAX1 (*Invitrogen, USA*) (Figura 10), gerando, portanto, o pS1IBV-Br. O plasmídeo deve então ser sequenciado para confirmar se o gene foi inserido na orientação correta.

A expressão dos plasmídeos recombinantes pode ser demonstrada através de ensaio de imunofluorescência indireta (IFA), utilizando células transfectadas contendo tanto o plasmídeo pVAX1 vazio como o pS1IBV-Br.

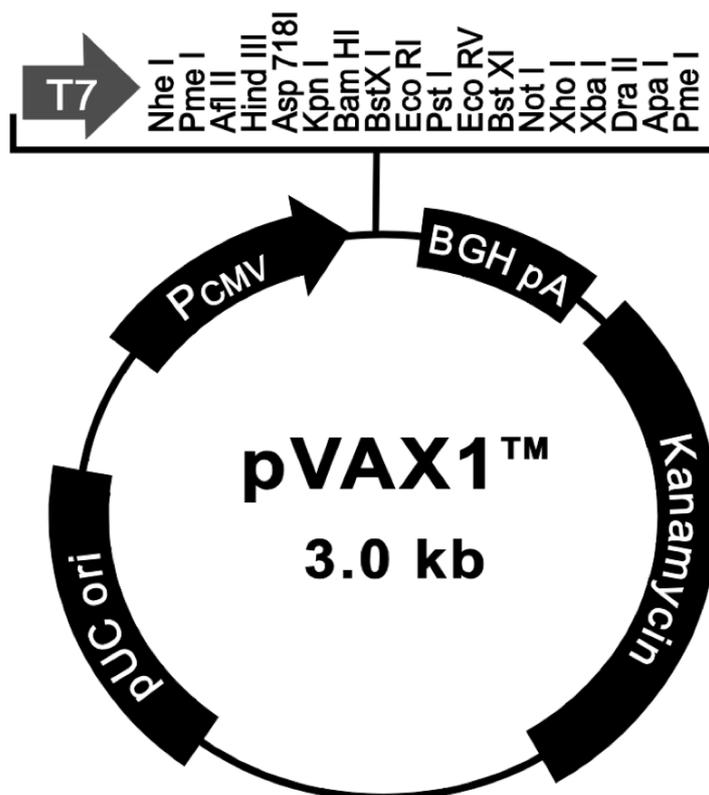


FIGURA 10 – Mapa do vetor pVax1™.
 Fonte: Invitrogen™ (2012).

3.2 Preparação das nanopartículas de quitosana

O método utilizado para a formação das partículas de quitosana é o método de gelificação iônica (Figura 11). Esse método é vantajoso pois o processo é simples, evitando o uso de solventes orgânicos e temperaturas muito elevadas, permitindo assim o encapsulamento de moléculas frágeis (RAMPINO et al., 2013).

Para preparação das NPs, uma solução de quitosana a 2,5 mg/mL é preparada dissolvendo o pó de quitosana em uma solução a 0,05% de ácido acético. A mistura fica em agitação por 24h e o pH é ajustado para 5,5 com solução de hidróxido de sódio 0,5 M. A concentração final desejada é ajustada através da diluição da solução em água deionizada.

Para preparar a NP de quitosana com o plasmídeo de DNA, utiliza-se o mesmo volume da solução de quitosana e da solução de plasmídeo de DNA (1:1), podendo ser testada em diferentes concentrações. Ambos são aquecidos

separadamente a 55°C por 30 minutos e em seguida são transferidos para o mesmo tubo e misturados em um vórtex a 2500 rpm.

Separadamente, uma solução de tripolifosfato (TPP) é preparada. O TPP é dissolvido em água deionizada na concentração de 0,25 mg/mL. Tanto a solução de quitosana como a TPP devem ser filtradas em membranas de 0,45 µm. Em seguida, a solução TPP é adicionada à solução de quitosana (0,3 mL/min) na concentração desejada (que deverá ser avaliada e propriamente determinada, pois influencia na porcentagem de encapsulamento), sob alta agitação magnética e em temperatura ambiente. A suspensão é deixada em descanso por 30 min para que a gelificação ocorra (RAMPINO et al., 2013).

A NP contendo o plasmídeo de DNA é então coletada por centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos a 4°C, sendo o precipitado ressuscitado em tampão fosfato salino (PBS) (ZHAO et al., 2014a) e o sobrenadante armazenado para avaliação posterior. Essas NPs podem ser chamadas pS1IBV-Br-CS-NPs.

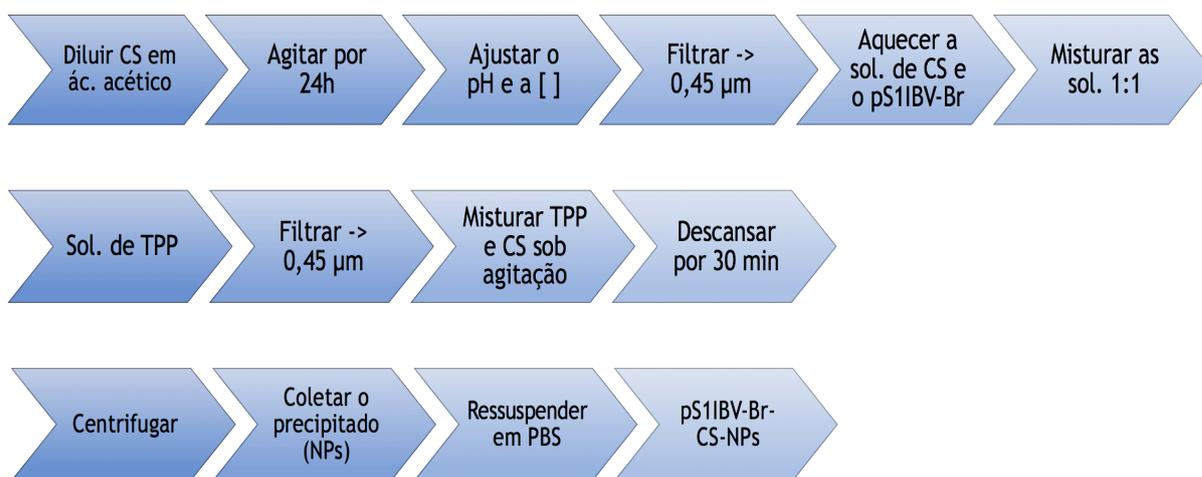


FIGURA 11 – Fluxograma de fabricação da pS1IBV-Br-CS-NPs.
Fonte: Arquivo pessoal (2017).

3.3 Avaliação da nanopartícula

A caracterização e avaliação morfológica e eletroquímica da pS1IBV-Br-CS-NPs deve ser feita utilizando microscopia eletrônica (TEM) e o *Zetasizer*. A TEM avalia as características morfológicas da superfície da partícula, enquanto o

Zetasizer (como o p. ex. o *Zetasizer Nano ZS*, da *Malvern Instruments, UK*), avalia o diâmetro e potencial ζ (zeta) da pS1IBV-Br-CS-NPs (ZHAO et al., 2014a). O potencial ζ é uma medida da magnitude das cargas eletrostáticas de atração ou repulsão entre partículas e está diretamente ligado à estabilidade (MALVERN INSTRUMENTS LTD, 2017).

A avaliação da eficiência de encapsulamento e capacidade de carregamento das pS1IBV-Br-CS-NPs pode ser determinada através do cálculo da diferença entre a quantidade de plasmídeo inicialmente adicionada com a quantidade de plasmídeos de DNA recuperados no sobrenadante após centrifugação, utilizando espectrofotometria ultravioleta (RAMPINO et al., 2013).

3.4 Toxicidade da partícula

Para avaliar a toxicidade e segurança da pS1IBV-Br-CS-NPs deve-se fazer testes citotóxicos utilizando cultivo celular (p. ex. células 293-T), bem como teste *in vivo*, utilizando pintinhos SPF imunizados com as NPs.

Para avaliar a citotoxicidade, a taxa de sobrevivência das células em contato com as NPs é calculada através de densidade ótica (OD_{450}), já no teste *in vivo* os resultados são obtidos a partir de alterações comportamentais e fisiológicas dos animais por algumas semanas (ZHAO et al., 2014a).

3.5 Avaliação da resposta imune da ave

A avaliação da resposta imune gerada pela pS1IBV-Br-CS-NPs administrada via óculo-nasal em aves pode ser feita a partir da imunização de aves SPF agrupadas em diversos grupos. Os grupos podem ser divididos em: aves imunizadas com PBS, aves imunizadas com a partícula sem o plasmídeo (CS-NPs), aves imunizadas apenas com o plasmídeo de DNA livre (pS1IBV-Br) e aves imunizadas com a pS1IBV-Br-CS-NPs. Amostras de sangue devem ser coletadas regularmente para avaliação dos níveis de IgG, IgA e proliferação de linfócitos.

Para avaliar a eficácia na proteção após a administração da pS1IBV-Br-CS-NPs, desafio com o IBV escolhido para o estudo deve ser feito. As aves de cada grupo podem ser infectadas via intramuscular com a cepa de IBV e os sinais clínicos observados. Animais selecionados aleatoriamente podem ser eutanasiados e *swabs* do trato respiratório superior, amostra da mucosa traqueal, pulmões, rins, cloaca e oviduto podem ser coletadas para avaliação.

4 Conclusão

A revisão bibliográfica apresentada deixa claro que a BI é uma doença viral aguda que acomete aves de várias idades causando prejuízos em diversas escalas da produção, sendo, portanto, altamente relevante para a avicultura industrial. Tendo em mente que a melhor forma de combater o IBV é através de medidas de biossegurança, incluindo a vacinação, devemos, assim, buscar cada vez mais melhorar esses padrões. É preciso que, diante dos argumentos apresentados, estudos sejam realizados para o desenvolvimento de vacinas mais eficientes e seguras contra o IBV no Brasil.

Conclui-se que a nanotecnologia é capaz de viabilizar amplas possibilidades para a potencialização de vacinas mais seguras, como as vacinas de DNA, protegendo o antígeno contra degradações prematuras pelo organismo bem como aumentar a imunogenicidade das mesmas. Observou-se que diversos nanomateriais podem ser aplicáveis como adjuvantes e/ou carreadores em formulações contra o IBV. Desta forma, pode-se dizer que, se aplicada corretamente, essa tecnologia pode vir a se tornar uma arma poderosa na luta contra a BI no país e no mundo.

5 Referências

- BALESTRIN, E. et al. 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. et al. Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 12, 2015.
- BANDE, F. et al. Pathogenesis and Diagnostic Approaches of Avian Infectious Bronchitis. **Advances in Virology**, v. 2016, 2016.
- BIJLENGA, G. et al. Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: a review. **Avian Pathology**, v. 33, n. 6, p. 550–557, 2004.
- BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 5, p. 631–651, 2002.
- CALLISON, S. A. et al. Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. **Journal of Virological Methods**, v. 138, n. 1–2, p. 60–65, 2006.
- CARD, J. W. et al. An appraisal of the published literature on the safety and toxicity of food-related nanomaterials. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 41, n. 1, p. 20–49, 2011.
- CARON, L. F. Etiology and Immunology of Infectious Bronchitis Virus. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 12, n. 2, p. 115–119, 2010.
- 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. **Vet. Res**, v. 38, p. 281–297, 2007.
- Ceva Saúde Animal**. Disponível em: <<http://www.ceva.com.br/Noticias/Ceva-no-Brasil/Ceva-Saude-Animal-lanca-a-primeira-vacina-viva-contra-a-bronquite-infecciosa-brasileira>>. Acesso em: 12 abr. 2017.
- CEVAWORLD. Bronquite Infecciosa Variante - maximizando a produção por meio da vacinação homóloga. **CevaWorld Maximune**, v. 9, n. 1, p. 16, 2016.
- CHHABRA, R. et al. 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.
- COOK, J.; JACKWOOD, M. W. **The Infectious Bronchitis (IB) information site**. Disponível em: <<http://www.bronquite-infecciosa.com>>. Acesso em: 25 mar. 2017.
- COOK, J. K. A.; JACKWOOD, M.; JONES, R. C. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. **Avian Pathology**, v. 41, n. 3, p. 239–250, jun. 2012.
- DE WIT, J. J. Detection of infectious bronchitis virus. **Avian pathology : journal of**

the **W.V.P.A**, v. 29, n. 2, p. 71–93, 2000.

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. 223–35, 2011.

DI FÁBIO, J.; VILLARREAL, L. Y. B. Bronquite infecciosa das galinhas. In: JÚNIOR, A. B. et al. (Eds.). . **Doenças das Aves**. 2. ed. Campinas-SP: FACTA, 2012. p. 631–648.

DINIZ, M. DE O.; FERREIRA, L. C. DE S. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 10–30, 2010.

EPIPHANIO, E. O. B. et al. Resultados preliminares da utilização de cultivos de anéis de traquéia para o estudo de estirpes brasileiras do vírus da bronquite infecciosa das galinhas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 54, n. 2, 2002.

FRANCO, A. S. M. A avicultura no Brasil. **Análise Conjuntural-Central de Inteligência de Aves e Suínos (CIAS)**, v. 39, n. 1, p. 2, 2017.

GILL, P. Nanocarriers, nanovaccines, and nanobacteria as nanobiotechnological concerns in modern vaccines. **Scientia Iranica**, v. 20, n. 3, p. 1003–1013, 2013.

GOMES, I. S. **Noções básicas sobre vacinação**. 2. ed. Teresina: EDUFPI, 2014.

GREGORY, A. E. et al. Vaccine delivery using nanoparticles. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. March, p. 1–13, 2013.

GROOT, R. J. DE et al. **Revision of the family Coronaviridae**. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/ICTV/proposals/2008.085-122V.v4.Coronaviridae.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2017.

GUO, Z. et al. Priming with a DNA vaccine and boosting with an inactivated vaccine enhance the immune response against infectious bronchitis virus. **Journal of Virological Methods**, v. 167, n. 1, p. 84–89, 2010.

IRACHE, J. M. et al. Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary therapeutics. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1–2, p. 47–71, 2011.

JACKWOOD, M. W.; DE WIT, J. J. (SJAAK). Infectious Bronchitis. In: SWAYNE, D. E. (Ed.). . **Diseases of Poultry**. 13. ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, Inc., 2013. p. 139–159.

KAMEKA, A. M. et al. 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.

KANO, F. S.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M. C. Vacina de DNA : aspectos gerais e sua aplicação na medicina humana e veterinária. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 4, p. 709–726, 2007.

KIM, J. S. Toxicity and Tissue Distribution of Magnetic Nanoparticles in Mice. **Toxicological Sciences**, v. 89, n. 1, p. 338–347, 2005.

KIM, M. G. et al. Nanotechnology and vaccine development. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 5, p. 227–235, 2014.

KJÆRUP, R. M. et al. Characterization of cellular and humoral immune responses after IBV infection in chicken lines differing in MBL serum concentration. **Viral**

immunology, v. 27, n. 10, p. 529–42, 2014.

LIU, S. W. et al. Genetic diversity of avian infectious bronchitis coronavirus strains isolated in China between 1995 and 2004. **Archives of Virology**, v. 151, n. 6, p. 1133–1148, 2006.

LOVATO, L. T.; DEZENGRINI, R. Coronaviridae. In: FLORES, E. F. (Ed.). . **Virologia veterinária**. 1. ed. Santa Maria: UFSM: Editora UFSM, 2007. p. 888.

MALVERN INSTRUMENTS LTD. **Zeta potential**. Disponível em: <<https://www.malvern.com/en/products/measurement-type/zeta-potential>>.

MAMO, T.; POLAND, G. A. Nanovaccinology: The next generation of vaccines meets 21st century materials science and engineering. **Vaccine**, v. 30, n. 47, p. 6609–6611, 2012.

MENDONÇA, J. F. P. et al. Bronquite infecciosa das galinhas: conhecimentos atuais, cepas e vacinas no Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 8, p. 2559–2566, 2009.

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

MUKTAR, Y. et al. Application of Nanotechnology for Animal Health and Production Improvement : A Review. **World Applied Sciences Journal**, v. 33, n. 10, p. 1588–1596, 2015.

NICOLAS, E.; BRITTON, P. Avian Infectious Bronchitis. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. [s.l.] OIE, 2013. v. 1.

NORDLY, P. et al. Status and future prospects of lipid-based particulate delivery systems as vaccine adjuvants and their combination with immunostimulators. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 6, n. 7, p. 657–672, 2009.

O'BRIEN, N.; CUMMINS, E. Ranking initial environmental and human health risk resulting from environmentally relevant nanomaterials. **Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering**, v. 45, n. 8, p. 992–1007, 2010.

OIE. **WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH MANUAL OF DIAGNOSTIC TESTS AND VACCINES (mammals , birds and bees) Sixth Edition**. [s.l: s.n.]. v. 2

OKINO, C. H. et al. 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. et al. Early immune responses and development of pathogenesis of avian infectious bronchitis viruses with different virulence profiles. **Plos One**, v. 12, n. 2, p. 1–17, 2017.

PEEK, L. J.; MIDDAUGH, C. R.; BERKLAND, C. Nanotechnology in vaccine delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 8, p. 915–928, 2008.

PENA, L. J. et al. Bronquite Infecciosa Das Galinhas. **Arq. Inst. Biol**, v. 72, n. 3, p. 397–404, 2005.

RAMPINO, A. et al. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 455, n. 1–2, p. 1–10, 2013.

- SANNA, V.; PALA, N.; SECHI, M. Targeted therapy using nanotechnology. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. Jan, p. 467–483, 2014.
- SCHEERLINCK, J. P. Y.; GREENWOOD, D. L. V. Particulate delivery systems for animal vaccines. **Methods**, v. 40, n. 1, p. 118–124, 2006.
- SCHEERLINCK, J. P. Y.; GREENWOOD, D. L. V. Virus-sized vaccine delivery systems. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19–20, p. 882–887, 2008.
- SCHRAND, A. M. et al. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 2, n. 5, p. 544–568, 2010.
- SMITH, J. et al. The early immune response to infection of chickens with Infectious Bronchitis Virus (IBV) in susceptible and resistant birds. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 256, 2015.
- SZEBENI, J. et al. Animal models of complement-mediated hypersensitivity reactions to liposomes and other lipid-based nanoparticles. **Journal of liposome research**, v. 17, n. 2, p. 107–17, 2007.
- UNDERWOOD, C.; VAN EPS, A. W. Nanomedicine and veterinary science: The reality and the practicality. **Veterinary Journal**, v. 193, n. 1, p. 12–23, 2012.
- VIKRAMA CHAKRAVARTHI, P.; BALAJI, S. N. Applications of nanotechnology in veterinary medicine. **Veterinary World**, v. 3, n. 10, p. 477–480, 2010.
- WICKRAMASINGHE, I. N. A. et al. The avian coronavirus spike protein. **Virus Research**, v. 194, p. 37–48, 2014.
- XIANG, S. D. et al. Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter? **Methods**, v. 40, n. 1, p. 1–9, 2006.
- YANG, T. et al. Multivalent DNA Vaccine Enhanced Protection Efficacy against Infectious Bronchitis Virus in Chickens. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 71, n. 12, p. 1585–1590, 2009.
- ZELTINS, A. Construction and Characterization of Virus-Like Particles : A Review. **Mol Biotechnol**, v. 53, p. 92–107, 2013.
- ZHAO, J.; CASTRANOVA, V. Toxicology of Nanomaterials Used in Nanomedicine. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 14, n. 8, p. 593–632, 2011.
- ZHAO, K. et al. 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, L. et al. Nanoparticle vaccines. **Vaccine**, v. 32, n. 3, p. 327–337, 2014b.