

13 Jinc

Jornada de
Iniciação Científica

Anais da 13^a Jornada de Iniciação Científica (JINC)



Universidade
do Contestado



Fundação Universidade do Contestado

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Suínos e Aves
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Anais da 13^a Jornada de Iniciação Científica (JINC)

*Fundação Universidade do Contestado
Embrapa Suínos e Aves
Concórdia, SC
2019*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Suínos e Aves

BR 153, Km 110
Caixa Postal 321
CEP 89.715-899 - Concórdia, SC
Fone: (49) 3441 0400
Fax: (49) 3441 0497
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Fundação Universidade do Contestado - UnC

Rua Victor Sopesla, 3.000
Bairro Salete - Caixa Postal 211
CEP 89.700-970 - Concórdia, SC
Fone: (49) 3441-1000
Fax: (49) 3441-1020
reitoria@unc.br
www.unc.br

Unidade responsável pela edição

Embrapa Suínos e Aves e Fundação
Universidade do Contestado - UnC

Instituição responsável pelo conteúdo

Fundação Universidade do Contestado - UnC

Coordenação editorial: *Tânia M. B. Celant*
Editoração eletrônica: *Vivian Fracasso*
Normalização bibliográfica: *Claúdia A. Arrieche*
Criação da logomarca: *Marina Schmidt*
Arte da capa: *Vivian Fracasso*
Foto da capa: *Jairo Backes*

Nota

Os artigos publicados são de inteira responsabilidade de seus autores. As opiniões neles contidas não representam, necessariamente, a visão da Embrapa Suínos e Aves. A revisão ortográfica e gramatical dos artigos é de inteira responsabilidade dos respectivos autores.

1ª edição

Publicação digitalizada (2019)

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Suínos e Aves

Jornada de Iniciação Científica (13. : 2019 : Concórdia, SC).

Anais da 13ª Jornada de Iniciação Científica (JINC), Concórdia,
23 de outubro de 2019. – Concórdia, SC : Fundação Universidade
do Contestado : Embrapa Suínos e Aves, 2019.
127 p.

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.
ISBN 000-00-00000-00-0

1. Produção Animal. 2. Suíno. 3. Ave. I. Embrapa Suínos e Aves.
II. Fundação Universidade do Contestado (UnC).

CDD 636

© Embrapa 2019

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DE UMA NOVA VACINA VIROSSOMAL PARA
PREVENÇÃO DA DOENÇA DE NEWCASTLE EM AVES****Gabrielly E. Bombassaro¹, Francisco Noé da Fonseca², Liana Brentano³,
Luciano Paulino⁴, Mayara Simonelly⁵ e Ana Paula Bastos³**¹Graduanda em Medicina Veterinária pela Instituto Federal Catarinense, Campus Concórdia, bolsista
CNPQ/PIBIC na Embrapa Suínos e Aves, gabibombassaro@gmail.com²Analista da Embrapa Suínos e Aves³Pesquisador da Embrapa Suínos e Aves⁴Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos⁵Pós-doutoranda da Universidade de Brasília**Palavras-chave:** NDV, nanopartícula, nanovacina.**INTRODUÇÃO**

A doença de Newcastle é uma enfermidade viral altamente contagiosa das aves silvestres e comerciais. O agente viral pertence à família Paramyxoviridae, gênero Avulavirus. NDV é um vírus envelopado, fita simples de RNA. Esse agente viral apresenta envelope lipídico, contendo duas glicoproteínas de superfície, proteína de fusão e hemaglutinina-neuraminidase (HN) (4). A infecção pode manifestar-se em doença subclínica ou até uma doença respiratória e nervosa com altíssima mortalidade e morbidade (2). As vacinas comerciais utilizam cepas virais atenuadas, podendo causar sintomas respiratórios em aves imunocomprometidas. Uma desvantagem no uso de vacinas vivas é que a indução de anticorpos reagentes ao vírus interfere na vigilância sorológica das aves em programas de vigilância ativa (3,4). Portanto, estratégias de vacinação são essenciais tanto na avicultura comercial e familiar. O objetivo deste trabalho é avaliar através dos ensaios *in vitro* o imunógeno virossomal de subunidade proteica do vírus NDV.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizada uma amostra de vírus NDV não patogênica (nº 209/04), cedida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Para alcançarmos o objetivo os virossomas foram desenvolvidos, caracterizados, titulamos a hemaglutinina e avaliamos a sua citotoxicidade. A preparação foi conforme descrita por Bron et al, (1993) com modificações (1). Os virossomas foram caracterizados quanto ao potencial Zeta e diâmetro por espalhamento de luz dinâmico em Zetasizer. Realizou-se titulação de hemaglutinina antes e depois do processamento e também a inoculação em ovos para verificar se os vírus foram inativados. Por microscopia eletrônica de transmissão registrou-se imagens das nanopartículas. Em linhagens imortalizadas de macrófagos RAW 264.7 avaliou-se o virossoma frente à citotoxicidade, crescimento e ensaio de endocitose. Realizou-se análises de MTT e contagem celular através do contador automático (Moxi, Orflo), nos tempos de 24h, 48h e 72h de exposição. Analisou-se ainda, a taxa de apoptose celular nas concentrações de 1:8 – 1:32, nos tempos de 24h e 48h de exposição aos virossomas através dos kits LIVE/DEAD® Viability/Cytoxicity (ThermoFisherScientific) e APO-DIRECT (BD Biosciences) utilizando citometria de fluxo e contagem de 100000 eventos. Camundongos C57BL/6, SPF, fêmeas de 6- 8 semanas de idade foram imunizados nos dias experimentais 1º e no 15º após primeira imunização. O sangue foi coletado por punção do plexo venoso retro-ocular nos dias 0 (antes da vacina) e 7 dias após cada imunização. Os camundongos fêmeas foram divididos em 3 grupos, tais como: I- grupo controle negativo, II- grupo com 2 imunizações da vacina virossomal intranasal; e III-grupo com 3 imunizações da vacina virossomal intranasal. Após 7 dias da última imunização, os animais foram sacrificados e os baços foram coletados para avaliação da resposta imune celular *in vitro*, para tal utilizamos os seguintes anticorpos para avaliar as células T de memória central (TCM) e células T de memória efetora (TEM): CFSE, CD44-PE, CD62L-PECY5, CD4-PECY7, IL2-FITC, CD3-FITC, TNF α -PE, IFN γ -APC, CD8-PECY7, kit de linfócito B de memória e kit de linfócito B efetora (BD).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas análises de caracterização observamos por microscopia eletrônica um concentrando de nanoestruturas na membrana dos virossomas. Ademais, os virossomas apresentaram um potencial Zeta de $-2,3 \pm 0,2$ mV e diâmetro médio de 109 ± 11 nm (Figura 1). A titulação de HA se manteve semelhante ao título da suspensão viral antes do processamento e não foi observado replicação viral na inoculação em ovos.

Nas análises de citotoxicidade *in vitro*, utilizamos três avaliações distintas. Primeiramente, realizamos a exposição dos virossomas em oito concentrações distintas na linhagem celular RAW 264.7, e posteriormente, realizamos o ensaio de MTT (Figura 2) e análise de viabilidade celular através do contador automático de células com qual kit? Houve coloração? Os resultados nas duas análises foram similares, o qual observamos uma viabilidade celular de 77 a 100%. Após essas duas análises, realizamos ainda análises de citotoxicidade por citometria de fluxo, utilizando o kit LIVE/DEAD® Viability/Cytoxicity (ThermoFisher) e o kit APO-DIRECT (BD). Nas análises do kit LIVE/DEAD® em 24h, a viabilidade variou de 78 a 85%, sendo o melhor resultado na diluição 1:16 (Figura 2), e em 48h, a variação foi de 81 a 88%, tendo resultados semelhantes as diluições 1:16 e 1:32. Os testes com o kit APO-DIRECT apresentaram viabilidade celular que variou de 98 a 99%, sendo a diluição 1:16 e 1:32 também apresentando resultados semelhantes de viabilidade celular. Nas análises de endocitose dos virossomas pelos macrófagos, encontramos resultados satisfatórios para as diluições de 1:16 e 1:32.

No plasma observamos uma resposta aumentada para linfócitos B, T CD4+ e CD8+ comparado ao grupo controle. Na avaliação da imunogenicidade da vacina no baço, os camundongos imunizados apresentaram respostas de amplitude e magnitude significativas com proliferação e secreção de citocinas por linfócitos T CD4+ e T CD8+, quando comparado ao grupo controle. As células induzidas pela vacina apresentaram um perfil polifuncional com tipo 1 de citocinas, incluindo TNF- α e IL-2. A vacina também induziu células T CD4+ de memória central (TCM) de longa duração, capazes de fornecer auxílio contínuo para células T CD8+.

CONCLUSÕES

Essa vacina, pode ser útil se utilizada isoladamente ou como fonte de auxílio cognato para células T CD8+ gerando resposta em uma grande proporção dos animais vacinados. Esses ensaios pré-clínicos da vacina a viabiliza para futuros ensaios clínicos na espécie alvo, neste caso as aves.

REFERÊNCIAS

1. BRON, R. et al. Preparation, Properties, and Applications of Reconstituted Influenza Virus Envelopes (Virosomes). **Methods In Enzymology**, v. 220, n. 1, p.313-331,1993.
2. DIMITROV, K. M. et al. Newcastle disease vaccines: A solved problem or a continuous challenge?. **Veterinary Microbiology**, Athens, v. 2016, p.126-136, 2017.
3. MAPA, Ministério de estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **IN 50**, 2013.
4. MAYERS, J.; MANSFIELD, K. L.; BROWN, I. H. The role of vaccination in risk mitigation and control of Newcastle disease in poultry. **Vaccine**, Surrey, v. 35, p.5974-5980, 2017.

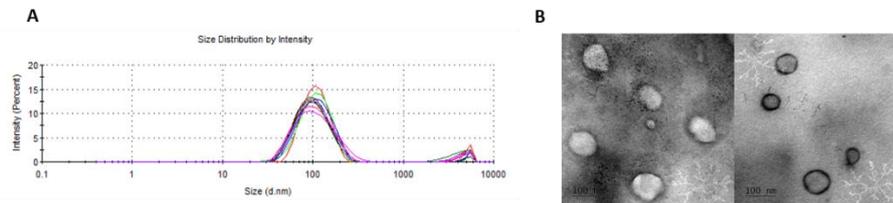


Figura 1. Caracterização dos virossomas. (A) Diâmetro dos virossomas, (B) Fotos dos virossomas por microscopia eletrônica de transmissão.

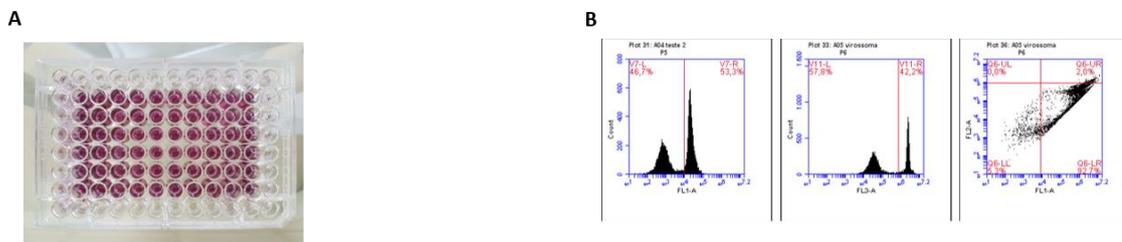


Figura 2. Análises de citotoxicidade in vitro dos virossomas. (A) Teste de MTT em macrófagos expostos ao virossoma. (B) Contagem das células viáveis por citometria de fluxo em 24h de exposição na diluição 1:16 utilizando o kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity. **a)** histograma do canal de emissão FL1; **b)** histograma do canal de emissão FL3; **c)** dotplot dos canais de fluorescência FL1 e FL2 com *gate*.

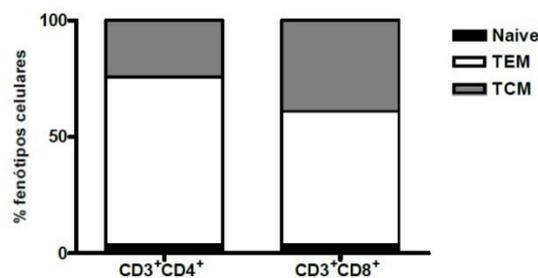


Figura 3. Avaliação fenotípica das células que proliferam após imunização com virossoma. Camundongos BALB/C fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, receberam 2 doses de 100 μ g de virossoma de NewCastle pela via intranasal, em intervalos de 15 dias, e foram sacrificados 15 dias após receberem a última dose. Pools de baços dos animais de cada grupo foram preparados para avaliação da resposta imune celular através de ensaio de CFSE contra estímulo *in vitro* com o pool dos peptídeos sintéticos.