UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Área de Tecnologia de Fermentações

Resposta imune ao parvovírus canino tipo 2 (CPV 2) em hidrogel
de quitosana administrado via sublingual

Fernanda Abdulack-Lopes

São Paulo
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Área de Tecnologia de Fermentações

Resposta imune ao parvovírus canino tipo 2 (CPV 2) em hidrogel de
quitosana administrado via sublingual

Versão original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Fernanda Abdulack-Lopes

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Marco Antônio
Stephano

São Paulo
2012

Fernanda Abdulack Lopes

Resposta imune ao parvovírus canino tipo 2 (CPV 2) em hidrogel
de quitosana administrado via sublingual

Comissão julgadora
da
dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Marco Antônio Stephano
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais, Márcia e Gerson, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la. Obrigado por todo o amor, incentivo, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador professor Dr. Marco Antônio Stephano pela oportunidade de crescimento intelectual e científico, pela orientação durante esses anos de mestrado. Obrigado pelos ensinamentos e por acreditar no meu trabalho.

Aos meus pais, Márcia e Gerson, pelo apoio e incentivo na minha formação.

Ao meu irmão, Guilherme, pela amizade e carinho.

A minha avó Abadia por todo o carinho e amor.

Aos meus colegas de laboratório, Laura Nascimento, Jony Takao, Marnen Carvalho, Patrícia Guglielmi, Mary Ellen Matiole e Andréa Parra, que sempre estiveram dispostos a ajudar e contribuir com meu trabalho.

À Aline Prestia Caricati e ao Celso Caricati do Laboratório Especial Piloto de Pesquisa e Desenvolvimento de Imunobiológicos Veterinários do Instituto Butantan.

À Lívia Duarte Rodrigues do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química pela ajuda com a manipulação dos camundongos.

Ao professor Reinaldo Giudici por ceder o seu Laboratório de Simulação e Controle de Processos da Engenharia Química.

Ao Dennis Chicoma Lara e a Maria Verónica Carranza, do Laboratório de Simulação e Controle de Processos da Engenharia Química por toda a ajuda prestada durante as análises por espectroscopia das nanopartículas.

À professora Dra. Marina Ishii pelo apoio e pela ajuda ao ceder seu laboratório para a realização dos testes com as amostras vacinais pela técnica de cromatografia líquida.

Ao professor Dr. Luiz Carlos Martins das Neves por todo ensinamento, pela ajuda com o manuseio do equipamento e interpretação dos dados durante os testes realizados por cromatografia líquida.

Ao professor Claudio Augusto Oller do Nascimento por ceder o seu Laboratório de Simulação e Controle de Processos (LSCP) da Engenharia Química para a realização dos testes no equipamento cromatográfico.

À Paula Bruzadelle Vieira e ao Rodrigo Ricardo Ramos pela ajuda na realização da cromatografia líquida de alta eficiência.

Ao professor Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo pela colaboração com a liofilização e ao técnico de laboratório Gledson Manso Guimarães por me ajudar com o processo de liofilização.

À BIA Separations por ter cedido as colunas monolíticas para os testes de purificação por cromatografia líquida e a seus funcionários Daniela Marc e Janez Jancar por todo o apoio e esclarecimentos prestados durante o projeto.

À Sylvain Tranchand e Altino José da Allcrom pela assistência e suporte prestados aqui no Brasil com a BIA Separations.

Ao Laboratório Biovet por se envolver com o projeto, por ter cedido a amostra vacinal e colaborado com a realização dos testes de PCR.

Aos funcionários do Laboratório Biovet, em especial para Jane Silveira Fraga, Alexandra Silva, Adriana Bravos e Wanderson dos Reis.

À secretaria de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pelo apoio durante esse período.

“Se você conta com alguém que tem menos qualidades que você, isso levará à sua degeneração. Se você conta com alguém com qualidades iguais às suas, você permanece onde está. Somente quando conta com alguém cujas qualidades são superiores às suas é que você atinge uma condição sublime”.

(Dalai Lama - Tenzin Gyatso)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
RESUMO	14
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUÇÃO	17
1.1.Parvovirose canina.....	17
1.2. Classificação do parvovírus canino	18
1.3. Característica do parvovírus	18
1.4. Epidemiologia	20
1.5. Patogenia	21
1.6. Manifestação clínica	21
1.7. Tratamento e Profilaxia	22
1.8.Diagnóstico	22
1.9. Imunização em filhotes	23
1.10. Imunidade	26
1.11. Imunidade de Mucosa	27
1.12. Mucosa sublingual	33
1.13. Imunoglobulina A	35
1.14. Quitosana (QS)	36
1.15. Tripolifosfato de sódio (TPP)	36
1.16. Nanopartículas de quitosana(QS) e tripolifosfato de sódio(TPP)	37
1.17. Liofilização	38
2. OBJETIVOS	41
2.1. Objetivo Geral	41
2.2. Objetivos Específicos	41
3. JUSTIFICATIVA.....	43
4. MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1. Amostra vacinal	45
4.2. Célula epitelial renal de gato (CRFK)	45
4.3. Replicação viral	46
4.4. Nanopartícula de quitosana	47
4.5. Caracterização da nanopartícula	48
4.6. Dosagem de proteínas (kit de ensaio de proteína micro BCA) ...	48
4.7. Liofilização	48
4.8. Animais utilizados	49
4.9. Resposta imunológica <i>in vivo</i>	49

4.10. Coleta de material biológico.....	50
4.11. ELISA.....	51
4.11.1 ELISA para determinação do título de IgG específico.....	51
4.11.2 ELISA para determinação do título de IgA secretora total	52
4.12. Microscopia eletrônica de varredura	52
4.13. Métodos estatísticos	53
 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	 55
5.1. Concentração de proteína na amostra vacinal	55
5.2 Nanopartícula de quitosana	56
5.3. Dosagem de proteína.....	57
5.4. Liofilização.....	58
5.5 Microscopia eletrônica de varredura.....	59
5.6 Análise da atividade imunológica	61
5.6.1 Ensaio imunoenzimático para a titulação de anticorpos de IgA secretora presente na saliva não específica.....	61
5.6.2. Ensaio imunoenzimático para a titulação de anticorpos de IgG específico.....	65
 6. CONCLUSÃO	 72
 REFERÊNCIAS	 73
 ANEXOS	 84
ARTIGO PUBLICADO	86

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Relação dos anticorpos maternos e a interferência na imunização (modificado: PFIZER VACCINES / Canine Parvovirus – Vanguard Plus https://animalhealth.pfizer.com/sites/pahweb/US/EN/Products/Pages/CADVaccinesParvo.aspx).....	25
FIGURA 2. Simplificação do sistema imune integrado. Mecanismos de defesa: barreiras anatômicas e fisiológicas, imunidade inata e imunidade adaptativa (modificado: TURVEY, S. E.; BROIDE, D. H. Innate immunity. Journal of Allergy and Clinical Immunology , v. 125, n. 2, Supplement 2, p. S24-S32, 2010).....	27
FIGURA 3. Representação de uma forma geral do sistema imunológico de mucosa. Local indutor da resposta imune de mucosa. Presença de linfócitos T e B que constituem o tecido linfóide associado à mucosa. Epitélio da mucosa por onde os antígenos são transportados ativamente e se encontram com as células apresentadoras de antígeno (APC), como células dendríticas (DC), macrófagos, células B e células dendríticas foliculares. As DCs podem capturar o antígeno e migrar através dos vasos linfáticos para os linfonodos regionais onde se tornam APCs ativas, estimulando os linfócitos T para a produção ou regulação da resposta imune, dependendo dos sinais de perigo que estão associados (Modificado Brandtzaeg, P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. Vaccine , v. 25, n. 30, p. 5467-5484, 2007).....	30
FIGURA 4. Representação da mucosa sublingual estimulada por um antígeno. Mostrando algumas particularidades celulares existentes na mucosa sublingual, como as células de Langerhans presentes no epitélio estratificado da mucosa sublingual. (Modificado: KWEON, M. Sublingual mucosa: A new vaccination route for systemic and mucosal immunity. Cytokine , v. 54, 2011)	35
FIGURA 5. Imunização sublingual	50
FIGURA 6. Resultado do teste de micro BCA, onde os poços A1/A2/A3/A4/A5 e A6 representam o controle do teste (branco). Os poços B1/B2 e B3 foram colocadas a proteína padrão (Proteína Sérica Bovina-BSA/ Sigma-Aldrich) e nos poços B4/B5 e B6 estão a amostra vacinal replicada em células CRFK. Tanto a proteína padrão como a amostra vacinal foram submetidas à diluição seriada nos poços seguintes	56
FIGURA 7. Resultado final do processo de liofilização.....	59
FIGURA 8. Microscopia eletrônica de varredura da amostra vacinal (aumento de 20000 x).....	59
FIGURA 9. Microscopia eletrônica de varredura mostrando estruturas nanoparticulada da amostra líquida formando agregado, após a centrifugação o precipitado formou um hidrogel de quitosana (aumento de 20000 x).....	60
FIGURA 10. Microscopia eletrônica de varredura da amostra liofilizada, mostrando a formação de um hidrogel (aumento de 20000 x).....	60

- FIGURA 11.** Resposta imune para IgA total presente na saliva de camundongos BALB/c após 1ª imunização por via sublingual. Camundongos imunizados com amostra vacinal (AV), hidrogel líquido (HLiq), hidrogel liofilizado (HLiof) e controle negativo (CN). Existe uma diferença significativa entre as colunas que possuem a mesma letra..... **61**
- FIGURA 12.** Resposta imune para IgA total presente na saliva de camundongos BALB/c após 2ª imunização por via sublingual. Camundongos imunizados com amostra vacinal (AV), hidrogel líquido (HLiq), hidrogel liofilizado (HLiof) e controle negativo (CN). Existe uma diferença significativa entre as colunas que possuem a mesma letra..... **62**
- FIGURA 13.** Resposta imune para IgA total presente na saliva de camundongos BALB/c após 3ª imunização por via sublingual. Camundongos imunizados com amostra vacinal (AV), hidrogel líquido (HLiq), hidrogel liofilizado (HLiof) e controle negativo (CN). Existe uma diferença significativa entre as colunas que possuem a mesma letra..... **63**
- FIGURA 14.** Resposta imune para IgA total presente na saliva de camundongos BALB/c após imunização intraperitoneal. Grupos de camundongos amostra vacinal (AV), hidrogel líquido (HLiq), hidrogel liofilizado (HLiof) e controle negativo (CN). Existe uma diferença significativa entre as colunas que possuem a mesma letra..... **64**
- FIGURA 15.** Cinética da produção de IgA da saliva pelos camundongos imunizados com amostra vacinal (AV), hidrogel de quitosana líquida (HLiq), hidrogel de quitosana liofilizada (HLiof) e controle negativo (CN). (Os números 1, 2 e 3 representam respectivamente a resposta obtida na primeira, segunda e terceira imunização)..... **65**
- FIGURA 16.** Resposta Imune humoral para Parvovirus canino em camundongos BALB/c após 2ª imunização por via sublingual. Camundongos imunizados com amostra vacinal (AV), hidrogel líquido (HLiq), hidrogel liofilizado (HLiof) e controle negativo (CN). Existe uma diferença significativa entre as colunas que possuem a mesma letra..... **66**
- FIGURA 17.** Resposta Imune humoral para Parvovirus canino em camundongos BALB/c após 3ª imunização por via sublingual. Camundongos imunizados com amostra vacinal (AV), hidrogel líquido (HLiq), hidrogel liofilizado (HLiof) e controle negativo (CN). Existe uma diferença significativa entre as colunas que possuem a mesma letra..... **67**
- FIGURA 18.** Resposta Imune humoral para Parvovirus canino em camundongos BALB/c após imunização por intraperitoneal. Grupos de camundongos amostra vacinal (AV), hidrogel líquido (HLiq), hidrogel liofilizado (HLiof) e controle negativo (CN). Existe uma diferença significativa entre as colunas que possuem a mesma letra..... **68**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Resultados do tamanho médio do (TM) e IDP da nanopartícula de quitosana com amostra vacinal. Primeira imunização. A solução de quitosana apresentou um pH 5,00 e a solução de TPP pH 9,10. As soluções finais obtidas pelo método de geleificação iônica foram avaliadas pelo aparelho <i>N4 Plus Submicron Particle Size Analyzer</i> . (* Destinada ao processo de liofilização).....	56
TABELA 2. Resultados do tamanho médio do (TM) e IDP da nanopartícula de quitosana com amostra. Segunda imunização. A solução de quitosana apresentou um pH 5,00 e a solução de TPP pH 9,10. As soluções finais obtidas pelo método de geleificação iônica foram avaliadas pelo aparelho <i>N4 Plus Submicron Particle Size Analyzer</i> . (* Destinada ao processo de liofilização).....	56
TABELA 3. Resultados do tamanho médio do (TM) e IDP da nanopartícula de quitosana com amostra vacinal. Terceira imunização. A solução de quitosana apresentou um pH 5,00 e a solução de TPP pH 9,10. As soluções finais obtidas pelo método de geleificação iônica foram avaliadas pelo aparelho <i>N4 Plus Submicron Particle Size Analyzer</i> . (* Destinada ao processo de liofilização).....	57
TABELA 4. Determinação da quantidade de proteínas no sobrenadante pelo método de micro BCA e cálculos da taxa de associação do antígeno (amostra vacinal) agregada a quitosana realizados na primeira imunização.....	57
TABELA 5. Determinação da quantidade de proteínas no sobrenadante pelo método de micro BCA e cálculos da taxa de associação do antígeno (amostra vacinal) agregada a quitosana realizados na segunda imunização.....	57
TABELA 6. Determinação da quantidade de proteínas no sobrenadante pelo método de micro BCA e cálculos da taxa de associação do antígeno (amostra vacinal) agregada a quitosana realizados na terceira imunização.....	58
TABELA 7. Valores de * <i>P</i> para nível de significância de 0,05 da resposta imune de mucosa para Ig A total de camundongos imunizados com amostra vacinal, nanopartícula líquida, nanopartícula liofilizada e controle negativo. A comparação entre os tratamentos foi feita pelo teste <i>t</i> de Student.	62
TABELA 8. Valores de * <i>P</i> para nível de significância de 0,05 da resposta imune de mucosa para Ig A total de camundongos imunizados com amostra vacinal, nanopartícula líquida, nanopartícula liofilizada e controle negativo. A comparação entre os tratamentos foi feita pelo teste <i>t</i> de Student.	62
TABELA 9. Valores de * <i>P</i> para nível de significância de 0,05 da resposta imune de mucosa para Ig A total de camundongos imunizados com amostra vacinal, nanopartícula líquida, nanopartícula liofilizada e controle negativo. A comparação entre os tratamentos foi feita pelo teste <i>t</i> de Student.	63

TABELA 10. Valores de $*P$ para nível de significância de 0,05 da resposta imune de mucosa para Ig A total de camundongos imunizados intraperitoneal com amostra vacinal. A comparação entre os tratamentos foi feita pelo teste t de Student.....	64
TABELA 11 Valores de $*P$ para nível de significância de 0,05 da resposta imune humoral para Ig G específica de camundongos imunizados com amostra vacinal, nanopartícula líquida, nanopartícula liofilizada e controle negativo comparados por teste t de Student	66
TABELA 12. Valores de $*P$ para nível de significância de 0,05 da resposta imune humoral para Ig G específica de camundongos imunizados com amostra vacinal, nanopartícula líquida, nanopartícula liofilizada e controle negativo comparados por teste t de Student).....	67
TABELA 13. Valores de $*P$ para nível de significância de 0,05 da resposta imune humoral para Ig G específica de camundongos imunizados intraperitoneal com amostra vacinal. Grupos comparados por teste t de Student.....	68

RESUMO

ABDULACK-LOPES, F. **Resposta imune ao parvovírus canino tipo 2 (CPV 2) em hidrogel de quitosana administrado via sublingual**, 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A parvovirose canina é uma doença causada pelo parvovírus canino, um vírus pertencente à família *Parvoviridae*. A doença causa quadros agudos de gastroenterite hemorrágica altamente contagiosa, e é responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente, em cães jovens. O principal agente etiológico desencadeador da doença é o parvovírus canino tipo 2 (CPV 2). As vacinas parenterais comercializadas contra esse vírus não são adequadas para filhotes com menos de 45 dias de idade. Além disso, essa doença não apresenta um tratamento específico, sendo a profilaxia de grande importância. O objetivo desse trabalho foi desenvolver um antígeno de entrega vacinal de modo a proteger o animal antes do seu desenvolvimento imunológico. Através do aumento da produção de IgA total a partir da primeira imunização e da resposta sistêmica de IgG específica a partir da segunda imunização em camundongos, foi possível verificar que as superfícies de mucosa são ativas imunologicamente, desde o nascimento do animal como também capazes de estimular tanto a resposta local quanto a sistêmica em camundongos imaturos e adultos. No intuito de proteger também esses jovens animais, a imunização por via sublingual mostrou-se uma técnica promissora. Em comparação com os grupos de camundongos imunizados com a amostra vacinal e o hidrogel líquido, o grupo que recebeu o hidrogel liofilizado teve uma melhor resposta imunológica, uma vez que a técnica de liofilização aumentou a característica de mucoadesividade da quitosana e consequentemente aumentou o tempo de permanência do hidrogel na mucosa sublingual.

Palavras-chave: imunologia, mucosa sublingual, vacina, parvovirus canino.

ABSTRACT

ABDULACK-LOPES, F. **Immune response to canine parvovirus type 2 (CPV 2) formulated with chitosan hydrogel and delivered by sublingual route**, 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Canine parvovirus is a virus that belongs to the *Parvoviridae* family. The disease causes acute hemorrhagic gastroenteritis, which is highly contagious and responsible for high rates of morbidity and mortality, especially in puppies. The main etiologic agent of this disease is canine parvovirus type 2 (CPV 2). Nowadays, there is a commercial parenteral vaccine against this virus, but it is not suitable for puppies under 45 days old. This disease has no specific treatment and the prophylaxis has a great importance. The aim of this study was to develop a sublingual delivery vaccine that protect the animals before their 45 days. By increasing the total IgA production from the first immunization and systemic specific IgG response after the second immunization in mice, it demonstrated that mucosal surfaces are immunologically active since birth and capable of stimulating both systemic and local response in puppies and adults. In order to protect these puppies, mucosal immunization is a promising technique. The group that received lyophilized hydrogel had a better immune response, since the lyophilization technique increased the mucoadhesive of chitosan and consequently the residence time of the lyophilized hydrogel at sublingual mucosa.

Keywords: immunology, sublingual mucosa, vaccine, canine parvovirus.

1. INTRODUÇÃO

1.1.Parvovirose canina

O parvovírus canino (CPV) inicialmente descrito no fim dos anos 60 foi isolado das fezes de cão e recebeu o nome de ``vírus minúsculo dos cães`` (MVC – minute virus of canines) (BINN *et al.*, 1970). Mais tarde esse vírus foi denominado parvovírus canino tipo 1 (CPV 1), para distinguir do parvovírus canino tipo 2 (CPV 2), identificado posteriormente no fim dos anos 70 e começo dos anos 80 (KELLY, 1978; APPEL *et al.*, 1979; CARMICHAEL e BINN, 1981; LAMM e REZABEK; 2008).

Essa nova estirpe viral considerada mais virulenta tornou-se clinicamente importante (OHSHIMA *et al.*, 2004) e devido à falta de uma imunidade preexistente a doença espalhou-se rapidamente e se tornou comum no mundo (GODDARD e LEISEWITZ, 2010).

No Brasil os primeiros relatos ocorreram durante 1979 na Região Sudeste do país (HAGIWARA *et al.*, 1980). Desde a sua emergência, o CPV é considerado como um importante causador de mortalidade em cães jovens. A incidência contínua de enterite por CPV atribui-se ao fato desse vírus possuir a capacidade de mutação, surgindo assim novas subespécies mais virulentas e resistentes (GODDARD e LEISEWITZ, 2010).

Nas enterites causadas por vírus, a diarreia representa a principal alteração clínica e há uma perda do equilíbrio hidroeletrólítico no lúmen intestinal o que leva à produção de fezes líquidas ou pastosas, com a presença ou não de sangue (MIMS *et al.*, 1995; TAMS, 1996). Alterações na motilidade intestinal, pH, ácidos biliares, dieta, superfície de mucosa e capacidade de oxigenação podem ser fatores complicadores na manutenção da simbiose existente entre a microbiota intestinal e o hospedeiro (STROMBECK e GUILFORD, 1991).

Um cão infectado com CPV, na ausência de um tratamento sintomático, possui chance de sobrevivência menor que 9,1%, e com a instituição de um tratamento a chance aumenta consideravelmente até 64% (OTTO *et al.*, 1997).

O CPV 1 ou MVC, distinto do CPV 2, tem mantido a sua sequência de DNA relativamente estável durante os anos (OHSHIMA *et al.*, 2004). A sua

estrutura gênica é mais relacionada com o parvovírus bovino, com 43% de identidade. Nos animais adultos afetados com CPV 1, os sinais clínicos como diarreia, vômito e dispneia geralmente não aparecem (assintomáticos), os quais são mais fáceis de serem observados em cães com menos de 4 semanas de idade (LAMM e REZABEK; 2008).

A origem do CPV 2 é bastante discutida e várias hipóteses foram apresentadas para o seu surgimento (LAMM e REZABEK; 2008; TRUYEN; 2006).

Uma delas é que o CPV 2 apareceu como agente etiológico causador de uma gastroenterite hemorrágica, perda de apetite, vômito, prostração, leucopenia e miocardite principalmente em filhotes (KELLY, 1978; APPEL *et al.*, 1979; MOHAN RAJ *et al.*, 2010).

Novas variantes antigênicas do CPV 2 foram surgindo gradativamente na população canina: CPV-2a, CPV-2b caracterizadas nos anos 80 e em 2001 e o CPV-2c foi relatado pela primeira vez na Itália (BUONAVOGLIA *et al.*, 2001; LAMM e REZABEK, 2008; MOHAN RAJ *et al.*, 2010).

Essas variações existentes do CPV 2 estão associadas com adaptações genéticas que ocorreram através da mudança de alguns aminoácidos da proteína estrutural (VP2) do capsídeo viral. Embora haja a prevalência de vários tipos antigênicos no mundo, as vacinas comerciais são baseadas na estirpe viral original (CPV 2) (MOHAN RAJ *et al.*, 2010; TRUYEN, 2006) e em alguns países no CPV 2a (MOHAN RAJ *et al.*, 2010).

1.2. Classificação do parvovírus canino

Na classificação taxonômica a família *Parvoviridae* é dividida em duas subfamílias: *Parvovirinae* (infecta hospedeiros vertebrados) e *Densovirinae* (infecta invertebrados) (PARRISH e TRUYEN, 1999; COTMORE e TATTERSALL, 1987). A subfamília *Parvovirinae* por sua vez é dividida em cinco gêneros: *Dependovirus*, *Erythrovirus* (inclui o parvovírus humano B19), *Amdovirus*, *Bocavirus* e *Parvovirus*, sendo este último o gênero do parvovírus canino tipo 2 (NCBI, 2011)

1.3. Característica do parvovírus

Os vírus são dependentes da maquinaria celular do hospedeiro para sua replicação. O genoma dos vírus é basicamente composto de ácido nucleico: RNA ou DNA e uma cobertura proteica, denominada capsídeo, além dessas estruturas muitos vírus possuem uma membrana externa adicional; o envelope (MURPHY *et al*, 1999).

Os membros da família *Parvoviridae* estão amplamente distribuídos na natureza. Composto por vírus de tamanho pequeno, não detém um envelopado lipoproteico e possuem o seu genoma constituído por uma fita simples linear de DNA. São conhecidos por causar infecção em uma variedade de espécies de mamíferos, sendo a sua maioria espécies-específicas, ou seja, o CPV-2 em condições naturais somente irá se replicar no organismo dos integrantes da família *Canidae* (GODDARD e LEISEWITZ, 2010; MOHAN RAJ *et al.*, 2010; LAMM e REZABEK, 2008; PARRISH e TRUYEN, 1999; COTMORE e TATTERSALL, 1995; REED *et al.*, 1988).

O genoma viral possui apenas um filamento de DNA que consiste em aproximadamente 5.150 nucleotídeos, contendo na extremidade 3' e 5' sequências palindrômicas de aproximadamente 150 nucleotídeos (REED *et al.*, 1988).

Como consequência de sua estrutura sem envelope, o CPV-2, como todos os parvovírus é extremamente estável e resistente a influências ambientais e pode persistir no meio por meses, estável a variações de pH (3.0 a 9.0) e temperatura (SIEGL, 1984).

Assim o contato com roupas, fômites e pisos contaminados pode levar o animal a desenvolver a doença. Detergentes e desinfetantes comuns não conseguem inativar o vírus, uma opção existente no mercado é o hipoclorito de sódio, porém para que ocorra a inativação, o vírus deve ficar exposto por no mínimo uma hora ao desinfetante (GODDARD e LEISEWITZ, 2010).

As partículas do CPV-2 são esféricas, com o diâmetro de aproximadamente 26 nm (255 Å) e o capsídeo possui uma simetria icosaédrica (TSAO *et al.*, 1991). A massa molecular da partícula viral completa varia de 5.5 a 6.2×10^6 daltons (MORAES e COSTA, 2007).

As proteínas estruturais que compõem o capsídeo viral variam na quantidade de acordo com o vírus, porém as proteínas VP1 e VP2 são as

principais responsáveis por se ligarem aos receptores da célula hospedeira (LAMM e REZABEK, 2008; HUEFFER e PARRISH, 2003).

A proteína VP1 difere da VP2, pois possui na região amino-terminal mais de 154 - 227 aminoácidos. Nas partículas infecciosas, a clivagem de 15 – 20 aminoácidos na região amino-terminal da VP2 origina a proteína VP3 de 63 kDa (TSAO *et al.*, 1991). Essa clivagem parece ter um papel importante para a infectividade viral, uma vez que expõe sequências ricas em glicina, importantes na interação com a membrana celular (WU e ROSSMAN, 1993).

O capsídeo apresenta uma constituição de 60 cópias das proteínas entre elas 5-6 cópias de VP1 e 54-55 cópias de VP2 e possuem a massa molecular variando de 83 – 86 kDa e 64 – 66 kDa, respectivamente (TSAO *et al.*, 1991).

1.4. Epidemiologia

O CPV 2 em condições naturais acomete canídeos selvagens e domésticos e logo que surgiu encontrou uma população sem nenhuma imunidade prévia, acarretando assim a disseminação da doença rapidamente (GODDARD e LEISEWITZ, 2010).

Os cães infectados com CPV 2 não desenvolvem necessariamente a doença, muitos são infectados naturalmente e não chegam nem a evidenciar sinais clínicos. Quando a patologia aparece, as manifestações clínicas são mais graves nos jovens e filhotes, que muitas vezes também abrigam helmintos, protozoários e bactérias. Em animais susceptíveis, a incidência de um quadro grave e morte é bastante alto (GREENE, 2006).

O contágio na maioria das infecções são resultantes do contato com as fezes contaminadas, uma vez que o vírus é extremamente resistente (SIEGL, 1984) Além disso, pessoas, insetos e roedores são vetores do parvovírus (GREENE, 2006).

O período de incubação varia de 7 a 10 dias (GREENE, 2006) e a doença pode ser observada em cães de qualquer raça, sexo ou idade (PRATELLI *et al.*, 2001; YULE *et al.*, 1997). Cães filhotes entre 6 semanas e 6 meses de idade apresentam mais predisposição à infecção, devido a fatores

como falta de imunidade, parasitas intestinais, superpopulação, falta de higiene e condições de estresse (GODDARD e LEISEWITZ, 2010).

1.5. Patogenia

A transmissão ocorre de cão para cão pela via oronasal. Os cães infectam-se pela ingestão ou inalação do CPV (GODDARD e LEISEWITZ, 2010; PRATELLI *et al.*, 2001; YULE *et al.*, 1997). Após a exposição oral/nasal ao CPV, a replicação ocorre principalmente no tecido linfóide da orofaringe e após a multiplicação ganham a corrente sanguínea (fase de viremia). Nessa fase o CPV espalha-se para os órgãos do corpo; principalmente aqueles que apresentam divisão celular rápida como é o caso das células intestinais (LAMM e REZABEK, 2008; PRATELLI *et al.*, 2001).

O ciclo de replicação do CPV é iniciado pelo reconhecimento e interação do capsídeo viral com os receptores celulares de transferrina (*canine transferrin receptor – TFR*), uma glicoproteína de membrana encontrada em grande quantidade em células com alta taxa de mitose (JONES *et al.*, 2000; PALERMO *et al.*, 2006).

O CPV infecta o epitélio germinativo da cripta intestinal, causando destruição do epitélio e colapso das vilosidades e levando à perda da capacidade de absorção (HOSKINS, 1997; OTTO *et al.*, 1997). Essas alterações patológicas desencadeiam o desenvolvimento de sinais clínicos como vômitos e diarreia, característicos da doença (POLLOCK e CARMICHAEL, 1982).

1.6. Manifestação clínica

As manifestações clínicas estão associadas ao intestino e coração, principais órgãos afetados (GREENE, 2006).

Animais com menos de 8 semanas infectados pelo CPV geralmente apresentam uma miocardite e morrem 24 horas após o aparecimento dos sinais clínicos. A progressão do quadro é bastante rápida e os sinais clínicos incluem dispnéia, choro e êmese (GODDARD e LEISEWITZ, 2010).

O quadro agudo de enterite, o qual aparece em filhotes, inicialmente inclui sinais inespecíficos como anorexia, depressão, letargia e febre (GODDARD e LEISEWITZ, 2010) e só após 24 a 48 horas desses sinais aparecem sintomas mais característicos como vômito e diarreia (a diarreia pode variar de aspecto mucoso ou sanguinolento). Esse quadro leva o animal a uma rápida desidratação e a infecção secundária não demora a aparecer (LAMM e REZABEK, 2008)

Com o trato intestinal já comprometido pela infecção viral, aumentam as chances de translocação bacteriana. Essas bactérias entram na corrente sanguínea (septicemia) e estimulam uma resposta inflamatória sistêmica, que por sua vez ativa a cascata de coagulação acarretando a formação de trombos intravasculares disseminados (CID) e o animal vem a óbito (GREENE, 2006; GODDARD e LEISEWITZ, 2010).

1.7. Tratamento e Profilaxia

O conhecimento da prevalência e distribuição de infecções virais em animais domésticos são de grande utilidade para indicar a necessidade de vacinação e direcionar medidas de controle (MURPHY *et al.*, 1999).

A prevenção do CPV através da vacinação é essencial, uma vez que o tratamento existente não é específico para a doença e sim um suporte baseado nos sintomas apresentados pelo animal (LAMM e REZABEK, 2008). Caso esse tratamento não seja realizado, o prognóstico é ruim e a chance de sobrevivência passa a ser menor que 10% (GODDARD e LEISEWITZ, 2010).

Portanto a vacinação em cães é recomendada e encontra-se disponível no mercado um grande número de vacinas para a imunização, variando apenas a composição: com vírus inativado ou vírus vivo modificado (GREENE, 2006).

1.8. Diagnóstico

Como os sintomas apresentados pelo CPV-2 são inespecíficos, uma vez que outros patógenos podem causar os mesmos sintomas como vômito e

diarreia (MOCHIZUKI *et al.*, 1993), o diagnóstico clínico é confirmado apenas pelo diagnóstico laboratorial.

Para o diagnóstico laboratorial existem testes específicos e inespecíficos que podem ser utilizados concomitantemente como forma de complementação. O hemograma é constantemente utilizado para o diagnóstico do CPV-2, apesar de ser inespecífico. Geralmente um animal infectado com CPV-2 apresenta uma leucopenia e quanto mais acentuada essa leucopenia maior a sua relação com a gravidade da doença (JACOBS *et al.*, 1980).

O teste de ensaio imunoenzimático (ELISA) é feito a partir do soro dos animais infectados e serve tanto para detectar a resposta de anticorpos nos indivíduos (determinando assim seu status imunológico) como para a detecção dos patógenos (ACTOR, 2007).

Os métodos fenotípicos utilizando cultivos celulares e a detecção de antígenos, apesar de serem bastante utilizados, estão sendo substituídos pela detecção, caracterização e quantificação microbiana de ácidos nucleicos. A técnica conhecida como reação em cadeia pela polimerase (PCR) utiliza um par de oligonucleotídeos sintéticos denominados *primers* (iniciadores), cada um projetado para hibridizar no sentido 5' - 3' em um DNA de dupla fita alvo.

Cada *primer* hibridizado constitui um ponto de partida para a produção de uma fita de DNA complementar por meio da adição sequencial de deoxinucleotídeos (dNTP) usando DNA polimerases recombinantes derivadas de bactérias termófilas (MACKAY *et al.*, 2007).

Desario e colaboradores (2005) compararam os testes laboratoriais mais usados para o diagnóstico do CPV-2, tais como imunocromatografia, hemaglutinação, isolamento viral, PCR convencional e PCR em tempo real e chegaram à conclusão que o PCR convencional e o PCR em tempo real tiveram melhor correlação.

1.9. Imunização em filhotes

No fim do século XVIII, Geert Reinders, um agricultor holandês, notou que os bezerros nascidos de vacas que resistiram à peste bovina eram

refratários a essa enfermidade, mostrando então uma evidência imune de proteção passiva materna (PASTORET, 2007).

Nos mamíferos, a mãe é responsável pela imunidade dos filhotes, pois os anticorpos são transferidos para o recém-nascido através da placenta e do colostro (maior fonte de anticorpos) (WANER *et al.*, 1996; POLLOCK e CARMICHAEL, 1982).

Após 72 horas de vida, essa absorção pelo intestino começa a decair (POVEY, 1986) e por isso a ingestão de colostro nas primeiras horas após o nascimento é extremamente importante (DAY, 2007; PASTORET, 2007). Sob essas condições, raramente encontramos neonatos infectados com CPV (GODDARD e LEISEWITZ, 2010).

O título de anticorpos passivos é variável em uma mesma ninhada, já que depende do título de anticorpos no soro da mãe, da quantidade de colostro ingerido por cada um dos filhotes e do tempo decorrido do nascimento (POVEY, 1986).

Aproximadamente, a partir do décimo dia (GODDARD e LEISEWITZ, 2010) os anticorpos maternos circulantes recebidos começam a cair e uma medida para esse período de queda seria a vacinação via parenteral (MOREIN *et al.*, 2002; PASTORET, 2007).

No entanto fatores como imaturidade do sistema imunológico dos filhotes e presença de anticorpos maternos passivamente entregues, apesar de estarem em menor quantidade, interferem com a indução da imunidade ativa (MANICKAN *et al.*, 1997; PASTORET, 2007; SIEGRIST, 2001).

Esse exemplo de interferência é bem claro na medicina veterinária com a vacina para o CPV, já que a presença de anticorpos maternos nos filhotes neutralizam a vacina, tornando-a ineficiente e deixando os filhotes suscetíveis a infecção neste período (PASTORET, 2007; MARTELLA *et al.*, 2005).

Esse período recebe o nome de lacuna imunológica. Embora haja anticorpos maternos, esses não são suficientes para garantir proteção e ainda interferem com a imunização ativa e, como consequência, os animais se tornam passíveis de infecção (PASTORET, 2007).

Em 1982, Pollock e Carmichael demonstraram, mediante o teste conhecido como HI (inibição da hemaglutinação), que títulos de anticorpos maternos no filhote, maior que 1:20 são capazes de interferir na resposta

imune ativa após a administração da vacina, e não impede a infecção causada pelo vírus. Em contraste, os animais com títulos maiores de 1:64 são considerados protegidos / imunes.

FIGURA 1. Relação dos anticorpos maternos e a interferência na imunização (modificado: PFIZER VACCINES / Canine Parvovirus – Vanguard Plus <https://animalhealth.pfizer.com/sites/pahweb/US/EN/Products/Pages/CADVaccinesParvo.aspx>.)

Atualmente o protocolo de vacinação recomendado para o CPV são de 3 doses, administradas via parenteral no filhote, que deve ser aplicada após esse período de lacuna imunológica. A primeira dose tem início geralmente na sexta semana de vida - aproximadamente após 45 dias - e as duas doses restantes 21 e 42 dias respectivamente após a primeira dose (WANER *et al.*, 1996).

O aperfeiçoamento de vacinas que possam superar o problema de status imunológico imaturo e efeitos de bloqueio dos anticorpos passivamente transferidos é importante, pois imunizaria os animais nessa janela de susceptibilidade / lacuna imunológica (MOREIN *et al.*, 2002).

A limitação de uma resposta adequada em uma idade precoce pode ser superada pela utilização de adjuvantes e também pela administração de vacinas via mucosa. São opções interessantes, pois muitas vezes ativam o sistema imune inato (DE MAGISTRIS, 2006; JÓNSDÓTTIR, 2007), o qual

desempenha a função de modular a intensidade, qualidade e persistência da resposta imune adquirida (PULENDRAN e AHMED, 2006).

1.10. Imunidade

O sistema imunológico protege os seres vivos de uma diversidade de elementos estranhos, como micro-organismos patogênicos, toxinas e substâncias alergênicas. Ações coletivas e coordenadas desse sistema conseguem eliminar essas ameaças com a finalidade de manter o equilíbrio do organismo (CHAPLIN, 2010).

O sistema imune integrado, para fins didáticos, é classificado em dois mecanismos de resposta: sistema imune inato (natural) e sistema imune adaptativo (adquirido).

Por meio de mecanismos inespecíficos de defesa do hospedeiro, muitos patógenos são detectados e destruídos em poucas horas depois de entrarem no organismo. Essa primeira linha de defesa cabe à imunidade inata. Seus componentes fundamentais são: barreiras físicas e químicas, células fagocitárias e células *natural killers* (NK), proteínas do sangue (incluindo frações do sistema complemento e outros mediadores da inflamação) e proteínas denominadas citocinas, que regulam e coordenam várias atividades das células (TURVEY e BROIDE, 2010).

A resposta imune adaptativa se desenvolve quando essa linha de defesa inicial não consegue eliminar os patógenos. Fundamentalmente essa resposta imune baseia-se nos receptores específicos de antígenos expressados na superfície dos linfócitos B e T (CHAPLIN, 2010).

Ambos os linfócitos desenvolvem-se na medula óssea, porém enquanto os linfócitos B têm a sua maturação de forma progressiva na medula óssea, os linfócitos T migram para o timo para depois completarem esse processo (LEBIEN e TEDDER, 2008).

Concluído esse estágio de maturação, os linfócitos B e T entram na circulação sanguínea e migram para os órgãos linfoides, onde permanecem inativos (*naïve cells*), até serem estimulados por sinais enviados por moléculas e células.

Os linfócitos B se diferenciam em plasmócitos que são responsáveis por secretar anticorpos e os linfócitos T ativados dão origem às células T auxiliares $CD4^+$ e células T citotóxicas $CD8^+$ (CTLs). As células T $CD4^+$ podem ainda se diferenciar em células Th 1 (*T helper 1 cell*) e Th 2 (*T helper 2 cell*). De um modo geral a função efetora das células *T helper* é controlar a resposta imune (ABBAS *et al.*, 2007).

FIGURA 2. Simplificação do sistema imune integrado. Mecanismos de defesa: barreiras anatômicas e fisiológicas, imunidade inata e imunidade adaptativa (modificado: TURVEY, S. E.; BROIDE, D. H. Innate immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, Supplement 2, p. S24-S32, 2010).

1.11. Imunidade de Mucosa

Durante algumas décadas, cientistas e principalmente imunologistas preocuparam-se bastante em entender o funcionamento da imunidade sistêmica dos organismos para prevenção de doenças infecciosas, sem perceber que o sistema imune de mucosa também é uma importante arma de defesa (TAKAHASHI *et al.*, 2009).

As superfícies de mucosa estão constantemente expostas ao meio ambiente, são as principais portas de entrada de micro-organismos tanto os não nocivos como patogênicos, entre eles os vírus, bactérias, parasitas e substâncias ambientais causadoras de alergia (ÇUBURU *et al.*, 2007;

HOLMGREN e CZERKINSKY, 2005; MCCLUSKIE; DAVIS, 1999). As mucosas recobrem os tratos urogenital, digestivo, óptico e respiratório, possuindo barreiras físicas e químicas capazes de degradar e repelir uma grande parte dos patógenos (HOLMGREN e CZERKINSKY, 2005). Além dessas barreiras, as superfícies de mucosa são altamente ativas imunologicamente; a defesa é reforçada por inúmeros mecanismos de defesa inatos que cooperam intimamente com a imunidade adaptativa evitando a colonização e invasão.

O sistema imunológico pode ser dividido funcionalmente e didaticamente em dois compartimentos distintos que entram em ação quando necessário: o compartimento sistêmico, incluindo ossos, medula óssea, baço e gânglios linfáticos e o compartimento de mucosa, que compreende o tecido linfoide associado às superfícies de mucosa e glândulas externas secretoras (STAATS *et al.*, 1994).

Cada compartimento está associado tanto a uma resposta celular quanto a uma resposta humoral, porém a natureza das respostas imunes diferem em cada compartimento. Os anticorpos do compartimento sistêmico são principalmente do grupo das imunoglobulinas G (IgG), que têm como função principal neutralizar patógenos no sistema circulatório. Em contrapartida os anticorpos na mucosa com a função de impedir a entrada de patógenos no organismo são principalmente as imunoglobulinas A secretoras (IgAs), predominantes em secreções como saliva, lágrima, leite, mucosas do trato gastrointestinal, trato respiratório e geniturinário (JÓNSDÓTTIR, 2007; MCCLUSKIE e DAVIS, 1999).

Agregados de tecido linfoide não encapsulados e denominados genericamente de MALT (tecido linfoide associado à mucosa / mucosa-associated lymphoid tissue); para designar todo o sistema imune relativo às mucosas, apresentam principalmente linfócitos, no entanto células plasmáticas e macrófagos também estão presentes.

Essas células estão bem situadas para encontrar antígenos que superam a barreira epitelial e têm como função um papel importante na regulação da imunidade de mucosa, (ANACAK *et al.*, 2010) impedindo a entrada de micro-organismos nocivos e limitando a propagação desses patógenos (BRANDTZAEG, 2007).

O MALT pode ainda ser subdividido e recebe uma nomenclatura específica, por apresentar algumas particularidades na mucosa, conforme a localização anatômica dos tecidos linfoides: GALT (tecido linfoide associado ao intestino), NALT (tecido linfoide associado aos tecidos nasais e faringianos), BALT (tecido linfoide associado aos brônquios) (BRANDTZAEG, 2007; VAN DER LUBBEN *et al.*, 2001), SALT (tecido linfoide associado à pele) (ULLRICH, 2010) e as criptas sublinguais que são regiões consideradas os principais sítios/locais indutores da resposta imune de mucosa (OGRA, 2010).

Nos locais indutores do sistema imune de mucosa os antígenos são reconhecidos, endocitados, ou seja, englobados e apresentados às células B e T (linfócitos T e B); e nos locais efetores o anticorpo é secretado (MCCLUSKIE e DAVIS, 1999).

Nos anos 60 identificou-se diversos tipos de gamaglobulinas, utilizando-se o antissoro de IgA. Demonstrou-se que este estava presente na saliva e em outros fluidos biológicos, sendo o tipo de imunoglobulina predominante nas mucosas e secreções (TOMASI, 1962). Mais tarde a estrutura da molécula foi desvendada e além da descrição de suas cadeias e da porção secretória também foram observadas as diferenças entre a IgA presente no sangue e aquela presente nas mucosas (TOMASI *et al.*, 1965).

A maioria dos patógenos entram no organismo após a ingestão e/ou inalação; a primeira linha de defesa do sistema humoral de mucosa é a imunoglobulina A secretora, que constitui o anticorpo mais abundante presente nos tecidos de mucosa (BRANDTZAEG, 2010; VAN DER LUBBEN *et al.*, 2001).

Os anticorpos secretados, que são fornecidos pela mucosa local e glândulas exócrinas associadas, abrigam a maioria das células B (linfócitos B) ativas do organismo; funcionam para excluir os antígenos no epitélio da mucosa como vírus e endotoxinas nas células epiteliais sem causar danos aos tecidos (BRANDTZAEG, 2007).

As vacinas de mucosa têm sido um grande atrativo, por sua praticidade na administração, por ser uma alternativa mais segura diminuindo os riscos de contaminação e não provocando injúrias como no caso das aplicações de vacinas feitas através de agulhas (MITRAGOTRI, 2005), além de induzir tanto

uma resposta imune de mucosa como sistêmica (TAKAHASHI *et al* , 2009; HOLMGREN e CZERKINSKY, 2005).

FIGURA 3. Representação de uma forma geral do sistema imunológico de mucosa. Local indutor da resposta imune de mucosa. Presença de linfócitos T e B que constituem o tecido linfóide associado à mucosa. Epitélio da mucosa por onde os antígenos são transportados ativamente e se encontram com as células apresentadoras de antígeno (APC), como células dendríticas (DC), macrófagos, células B e células dendríticas foliculares. As DCs podem capturar o antígeno e migrar através dos vasos linfáticos para os linfonodos regionais onde se tornam APCs ativas, estimulando os linfócitos T para a produção ou regulação da resposta imune, dependendo dos sinais de perigo que estão associados (*Modificado Brandtzaeg, P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. Vaccine, v. 25, n. 30, p. 5467-5484, 2007).*

A maioria das vacinas utilizadas comercialmente é injetável, tendo como princípio básico conferir uma proteção, induzindo a produção de anticorpos séricos, ao invés de estimular uma resposta imune de mucosa (ÇUBURU *et al.*, 2007).

Os primeiros relatos obtidos da prática de vacinação via mucosa são do século XV. Culturas orientais praticavam formas diferentes para a imunização (McVEY e SHI, 2010; BORGES *et al.*, 2007). Na China, pessoas saudáveis adquiriam imunidade à varíola ao cheirar um pó feito das pústulas da doença, inseri-lo em cortes da pele ou pela ingestão de pulgas das vacas com varíola (BORGES *et al.*, 2007; MITAGOTRI, 2005).

A técnica oriental difundiu-se na Europa e, em 1796, o médico Edward Jenner após observar os pacientes e coletar dados por anos, retirou o conteúdo das pústulas de varíola das mãos de uma ordenhadeira chamada Sarah Nelmes e injetou-o em um menino de 8 anos de idade, James Phipps (McNALLY, 2001; HILLEMANN, 2000).

Essa inoculação desenvolvida por Jenner não foi por via mucosa, porém tornou-se um marco na história, pois ele foi o responsável pela primeira investigação clínica e desse ponto em diante a ciência voltou-se para estudos sobre vacinação e imunologia (HILLEMANN, 2000).

A vacinação de mucosa ficou evidente apenas nos anos 60, com a vacina Sabin oral de vírus vivo atenuado contra poliomielite (OPV). Recebeu esse nome em homenagem ao principal criador da vacina e responsável pela erradicação da doença em muitos países, doutor Albert Sabin (MITAGOTRI, 2005; MACLAUGHLIN, 2003).

Após o surgimento da vacina Sabin, outras vacinas de inoculação via mucosa contra os vírus começaram a ser estudadas. Atualmente, além da vacina Sabin, são licenciadas para uso humano a vacina de vírus vivo contra o rotavírus, administrada oralmente, (DENNEHY, 2007) e vacina de vírus vivo atenuado contra o vírus da influenza H1N1, administrada via nasal (AZIZ *et al.*, 2007). O estudo sobre vacinas orais não ficou restrito apenas aos vírus. Em 1985 surgiu uma vacina contra a bactéria causadora de cólera (LEVINE e KAPER, 1993).

Na medicina veterinária, pesquisas sobre vacinação via mucosa são escassas. O foco principal de esforços tem se mantido no controle do vírus da raiva nos animais silvestres, com a distribuição de iscas na Europa e América do Norte (RUPPRECHT *et al.*, 2005).

As vias de imunização via mucosa sublingual (NEGRI *et al.*, 2010), oral, intranasal, pulmonar, retal, vaginal (BORGES *et al.*, 2007) são um grande atrativo e desafio para prevenir doenças causadas por patógenos. A seleção das vias depende do patógeno alvo, da qualidade e do tipo de resposta esperada (NEGRI *et al.*, 2010).

Respostas imunes da mucosa geralmente são iniciadas em locais específicos da mucosa, como nas placas de Peyer (PP), que representam o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) e na cavidade orofaríngea,

representada por tecido linfóide associado aos tecidos nasais e faringianos (NALT). Apresentam características comuns por induzir células M, macrófagos, células dendríticas, células T CD4⁺ e CD8⁺ e imunoglobulina A secretória (IgAs). Essas células desempenham um papel central na iniciação de respostas imunes nas mucosas, pela captação, transporte, processamento e apresentação de antígenos.

A administração de um antígeno a um sítio de mucosa pode levar à produção de IgA em diferentes mucosas e glândulas. A IgA é a principal classe de anticorpo que pode ser eficientemente secretada através dos epitélios, desempenhando um papel crítico na defesa contra patógenos intestinais e respiratórios (DIETRICH *et al.*, 2003).

Todas as vias possíveis de administração via mucosa apresentam inúmeras vantagens, tais como: a possibilidade de neutralização dos patógenos na sua porta de entrada, menos exigência na qualificação de pessoas para administração da vacina, mais aceitação dos pacientes, uma vez que não se trata de um método invasivo (VAN DER LUBBEN *et al.*, 2001) e facilidade e rapidez na administração, principalmente se for necessário a vacinação em massa, diminuindo os riscos de injúrias e contaminação cruzada (PRATELLI *et al.*, 2001).

No mercado muitas vacinas circulantes contra o CPV são de vírus vivo atenuado, baseadas no tipo original do CPV 2, isolada no fim dos anos de 1970 (TRUYEN, 2006); e todas elas são administradas via parenteral, tendo como princípio básico conferir proteção e induzir a produção de anticorpos séricos, ao invés de estimular uma resposta imune de mucosa (ÇUBURU *et al.*, 2007).

Em geral as vacinas devem conter a estirpe viral mais recente, que implicará numa proteção mais completa, proporcionando uma imunização mais efetiva em relação às vacinas antigas (LAMM e REZABEK, 2008; TRUYEN, 2006).

Vacinas de mucosa são aplicadas diretamente nas superfícies das mucosas, o que resulta em melhor início de resposta imune humoral e mediada por células, pois há direcionamento e indução de mecanismos imunológicos em locais específicos dos tecidos linfóides associados à mucosa (MALT). Assim sendo, são capazes de induzir uma resposta imune tanto local quanto sistêmica (DIETRICH *et al.*, 2003), em comparação com vacinas parenterais

que são geralmente adequadas para prevenir doenças sistêmicas causadas por patógenos invasivos, pois sua habilidade em induzir uma resposta na mucosa é bastante limitada (OIEN *et al.*, 1994)

Os sistemas de entrega mucoadesivos são bastante variados, possuem como princípio básico aumentar o tempo de retenção dos antígenos na mucosa, interagir com o epitélio escolhido e aumentar a absorção e liberação de antígenos (SINGH *et al.*, 2001).

1.12. Mucosa Sublingual

A via sublingual já é utilizada rotineiramente na imunoterapia em casos de alergia. Alguns produtos já foram aprovados e são usados para esse tipo de tratamento: SLITone®, Sublivac®, Grazax®, Oralair®, AllerSlit®forte (AMORIJ *et al.*, 2012).

A mucosa sublingual (abaixo da língua) está localizada na boca com a mucosa gengival e o revestimento da bochecha. Essa região de mucosa vem ganhando interesse também na área imunológica relacionada à vacinação, pois tem se mostrado viável para o respectivo uso (PAVOT *et al.*, 2012).

Algumas vantagens nesse tipo de imunização são observadas em relação à administração parenteral. A mucosa sublingual apresenta uma grande superfície de absorção com alta vascularidade, o que garante uma absorção rápida da substância desejada (KWEON, 2011).

Moléculas entregues via sublingual são capazes de atravessar o epitélio escamoso, membrana basal e lâmina própria e através das veias são transportadas para a circulação sistêmica (WHEELER e SHARIF, 1996) e se mostram capazes de estimular uma resposta tanto de mucosa como sistêmica CHO *et al.*, 2010; AMUGUNI *et al.*, 2012).

Çuburu e colaboradores em 2007 demonstraram em camundongos que a aplicação de um antígeno proteico com adjuvante da toxina colérica, via sublingual, induz resposta imune de mucosa e sistêmica. A análise de citocinas evidenciou uma mistura do perfil de respostas Th1 e Th2, além da indução de linfócito T citotóxico.

Outros estudos com o vírus da influenza (SONG *et al.*, 2008) e com o papiloma vírus humano (CHO *et al.*, 2010) demonstraram em camundongos

que a administração sublingual desses vírus induziram uma resposta humoral e mediada por linfócitos T citotóxicos.

Amuguni e colaboradores em 2012 evidenciaram que a administração sublingual ou intranasal são capazes de estimular tanto uma resposta imune de mucosa como sistêmica em leitões e a imunização foi feita utilizando-se o *Bacillus subtilis*.

A vacinação sem a utilização de agulhas apresenta ainda a possibilidade de redução de custos, pois ao contrário da vacinação parenteral não requer tanto treinamento em relação aos cuidados com a manipulação (AMORIJ *et al.*, 2010).

Em relação à entrega de antígenos por outras vias de mucosa, a vantagem existente na administração via sublingual está ligada a não ocorrência de degradação de péptidos e/ou proteínas como ocorre no trato gastrointestinal com a entrega pela cavidade oral (KWEON, 2011).

A preocupação de segurança em relação à neurotoxicidade é mínima pela via sublingual, pois pela via nasal existe maior possibilidade da substância administrada atingir o sistema neurológico, além disso, existem chances de ocorrer perda por espirros e/ou corrimento da substância administrada (LEMIALE *et al.*, 2003; CHO *et al.*, 2010).

Substâncias denominadas mucosadesivas, aderem a uma superfície epitelial e conseguem através dessa aderência melhorar a distribuição da substância e aumentar a captação do antígeno, consequentemente favorecendo a resposta imune (EDSMAN e HÄGERSTRÖM, 2005; SMART, 2005).

O mecanismo mucoadesivo não está totalmente esclarecido, mas sabe-se que polímeros mucoadesivos interagem com a mucosa (ASANE *et al.*, 2008).

A capacidade de se dispersar em água, a presença de grupos carboxila e hidroxila, a propensão em formar pontes de hidrogênio e a flexibilidade da cadeia polimérica são propriedades que facilitam a interpolação entre as cadeias poliméricas e a mucina, proteína mais abundante na mucosa (BANSIL e TURNER, 2006; LINDEN *et al.*, 2008).

Nos últimos anos polímeros mucoadesivos baseados em transporte solúvel e particulado como a quitosana ganham espaço para a entrega de

proteínas pelas vias de mucosa (AMIDI *et al.*, 2010), sendo este um polímero de grande potencial para os sistemas de liberação de vacinas sublinguais.

FIGURA 4. Representação da mucosa sublingual estimulada por um antígeno. Mostrando algumas particularidades celulares existentes na mucosa sublingual, como as células de Langerhans presentes no epitélio estratificado da mucosa sublingual. (Modificado: KWEON, M. Sublingual mucosa: A new vaccination route for systemic and mucosal immunity. *Cytokine*, v. 54, 2011).

1.13. Imunoglobulina A

As moléculas de imunoglobulinas estão presentes em todos os vertebrados, com exceção de algumas espécies mais primitivas como por exemplo, a lampreia (NEZLIN, 1998). A molécula de IgA é a imunoglobulina mais abundante produzida pelos mamíferos, está presente no soro e nas secreções de mucosas (MACPHERSON *et al.*, 2001), como saliva, lágrima, colostro e também nas secreções do trato intestinal, respiratório e geniturinário.

Na cavidade oral a principal secreção é a saliva, a qual possui uma variedade de proteínas que desempenham um papel importante para manter a

defesa e o equilíbrio do organismo. A imunoglobulina A secretória (IgAs) é uma dessas proteínas que atuam na proteção, inibindo a aderência e penetração do micro-organismo no tecido da mucosa (POMARICO *et al.*, 2010).

Assim como a maioria dos anticorpos, a IgA dimérica é secretada pelos plasmócitos. Essa forma ocorre pela ligação de duas moléculas monoméricas de IgA que são unidas pela cadeia J, essa molécula é transportada e se une ao receptor polimérico de imunoglobulina (pIgR) nas células epiteliais. Um fragmento do pIgR, conhecido como componente secretor, se associa com a IgA e forma então a IgAs (BAUMANN *et al.*, 2010).

A ligação do componente secretor é importante, pois protege a IgAs de ser degradada por enzimas proteolíticas na mucosa.

1.14. Quitosana (QS)

A quitosana (QS), quimicamente nomeada de α (1-4) 2-amino-2-deoxi- β -D-glucano é considerada um biopolímero policatiônico. Ocorre naturalmente em alguns fungos, mas é comumente obtida pelo processo de desacetilação alcalina da quitina, um polissacarídeo estrutural abundante na natureza e componente básico do exoesqueleto de insetos e crustáceos, como caranguejos, lagostas e camarões (PRABAHARAN, 2008; BORGES *et al.*, 2007; AGNIHOTRI *et al.*, 2004).

Esse polímero pode ser encontrado em uma variedade de formas, diferenciando no peso molecular e grau de desacetilação. Esses aspectos são importantes, pois irão influenciar no produto final desejado com a QS (KEAN e THANOU, 2010).

A QS tornou-se um produto de múltipla utilidade. É aplicado em alimentos na agricultura, na biomedicina, em microcápsulas e nanopartículas (TSAI *et al.*, 2011). Suas características biológicas de biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade são favoráveis a esse amplo uso (GAN e WANG, 2007).

1.15. Tripolifosfato de sódio (TPP)

O TPP de fórmula molecular $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ é um composto inorgânico, que se apresenta comercialmente no estado sólido, em forma de um pó branco (RASKOVIC, 2007). O TPP é um poliânion utilizado com a quitosana para a formulação de nanopartículas, pois é um composto não tóxico, que através de forças eletrostáticas interage com a quitosana e forma redes iônicas reticuladas (YANG *et al.*, 2011).

1.16. Nanopartículas de quitosana(QS) e tripolifosfato de sódio (TPP)

A habilidade da QS em formar nanopartículas, sistemas poliméricos coloidais com partículas menores que um micrômetro (ABDELWAHED *et al.*, 2006; DESAI *et al.*, 1997), tem atraído grande interesse, principalmente da área médica: distribuição de vacinas, genes ou antioxidantes (TSAI *et al.*, 2011). A capacidade de incorporar e aderir da QS deve-se às interações eletrostáticas dos grupos de amina primário de carga positiva com as cargas negativas de outros componentes (TSAI *et al.*, 2011; CSABA *et al.*, 2009; GAN e WANG, 2007). Essa particularidade de aderência à superfície das mucosas torna as nanopartículas de QS uma opção vantajosa de entrega de antígenos via mucosa nasal, oral, sublingual, vaginal e pulmonar. Além disso, são capazes de aumentar a penetração das moléculas, abrindo caminho entre as células da junção epitelial (AMIDI *et al.*, 2010).

Nanopartículas, nanoesferas ou nanocápsulas podem ser obtidas de acordo com o processo utilizado. Os sistemas em geral são utilizados para ajudar na entrega de medicamentos em células-alvo. Esses sistemas de nanopartículas melhoraram a viabilidade, a sustentabilidade do efeito no tecido-alvo e a estabilidade dos agentes terapêuticos contra a degradação enzimática (ABDELWAHED *et al.*, 2006)

Alguns obstáculos como instabilidades física (agregação/fusão das partículas) e química (hidrólise de materiais poliméricos, vazamento de drogas de nanopartículas e reatividade química do medicamento durante o armazenamento) devem ser vencidos, pois algumas vezes limitam a utilização das nanopartículas. Observa-se frequentemente essas instabilidades quando

as suspensões aquosas de nanopartículas são armazenadas por um longo período de tempo (ABDELWAHED *et al.*, 2006; CHACÓN *et al.*, 1999).

As nanopartículas podem ser preparadas pela interação eletrostática, resultando na geleificação iônica entre a QS e o TPP (a interação necessita de condições de temperatura e pH), já em relação ao tamanho da nanopartícula é possível controlá-lo variando a relação QS e TPP (MORRIS *et al.*, 2011).

A fim de melhorar a estabilidade física e química desses sistemas, a água deve ser removida. Um processo comumente utilizado permite que a conversão de soluções ou suspensões em sólidos é o chamado *freeze-drying* ou liofilização (FRANKS, 1998).

1.17. Liofilização

Liofilização é o termo utilizado para designar o processo no qual a água é sublimada a partir de soluções congeladas, geralmente sob pressão reduzida, deixando uma massa porosa aproximadamente do mesmo tamanho e forma da massa congelada. Essa porosidade faz com que a reidratação seja rápida e completa (ABDELWAHED *et al.*, 2006; THAPA *et al.*, 2003).

Pode-se aplicar qualquer solvente para a remoção, porém em biotecnologia o interesse principal está ligado à água (PITOMBO, 2005). A liofilização é uma técnica amplamente utilizada para a estabilização, conservação de substâncias e preservação de micro-organismos, produtos alimentícios, produtos biológicos e fármacos, uma vez que as modificações físico-químicas são inibidas. Mais recentemente, passou a ser aplicada na preparação das nanopartículas para melhorar a sua estabilidade em longo prazo (ABDELWAHED *et al.*, 2006; CARPENTER *et al.*, 1997; THAPA *et al.*, 2003; WANG, 2000).

Essa preocupação na preparação deve-se ao fato de que em soluções aquosas, substâncias como peptídeos, proteínas e moléculas orgânicas estão sujeitas a uma variedade de reações, que são inadmissíveis por diminuir o desempenho necessário do produto e a segurança (FRANKS, 1998).

A liofilização é reconhecida como o melhor método para a obtenção de produtos desidratados, de alta qualidade. Atualmente esse método tem se difundido e é empregado inclusive em medicamentos que possuam a

capacidade de rápida dissolução por via oral, incluindo os de ação sublingual (PITOMBO, 2005).

O advento da liofilização industrial moderna pode ser ligado à necessidade de produção em larga escala de plasma sanguíneo e vacinas com maior estabilidade e tempo de validade (CONSTANTINO e PIKAL, 2004).

O processo de liofilização envolve basicamente três estágios. O primeiro estágio, que é o de congelamento, envolve a aquisição de uma matriz sólida. No segundo estágio ocorre a secagem primária, ou seja, a sublimação por meio da redução da pressão dentro da câmara de liofilização. Assim quando toda a água livre congelada for removida pela sublimação pode se dar por encerrada a secagem primária. O último estágio da liofilização compreende a secagem secundária, onde a água congelada é removida por aumento da temperatura até que o produto alcance a umidade residual desejada (PITOMBO, 2005).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- O presente trabalho teve como principal objetivo observar a resposta imune desenvolvida por um mecanismo de entrega sublingual da vacina do CPV 2 .

2.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver um mecanismo de entrega sublingual com o antígeno do CPV 2.
- Titular as imunoglobulinas, IgG sérica específica e IgA secretora total.
- Observar e comparar a resposta imune em camundongos Balb/c neonatos e adultos.

JUSTIFICATIVA

3. JUSTIFICATIVA

A parvovirose canina é uma doença entérica aguda que afeta principalmente cães jovens desde o desmame até os 6 meses de idade e apresenta altas taxas de morbidade e mortalidade.

Para o controle e profilaxia existem no mercado vários tipos de vacinas injetáveis, porém não são adequadas para proteger os filhotes no período conhecido como lacuna imunológica, o qual geralmente ocorre uma a duas semanas antes ou depois dos 45 dias de idade; quando a presença de anticorpos maternos interferem na imunização ativa e também não são suficientes para imunizar o filhote contra a infecção.

Do ponto de vista imunológico, as vacinas aplicadas via mucosa são interessantes para a proteção dos filhotes nesse período, pois são capazes de estimular uma resposta imune local e sistêmica, já que as superfícies de mucosa são ativas imunologicamente desde o nascimento do animal.

A via de mucosa sublingual é uma alternativa de administração do antígeno, por apresentar uma grande irrigação na cavidade bucal, secreção salivar e presença de linfonodos e por isso espera-se uma resposta imunológica.

Ainda em relação às vacinas por via de mucosa, deve-se ressaltar também a facilidade de aplicação, pois não exige pessoas com muita qualificação para administrá-la, mais aceitação dos pacientes e menor risco de contaminação e injúria, já que não há o uso de agulhas,

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostra vacinal

A amostra vacinal contendo vírus atenuado CPV 2, o qual o vírus foi cultivado em células de rim de gato (CRFK) foi cedida pelo Laboratório Biovet em janeiro de 2012. A amostra de 6 mL foi transferida para criotubos de 2 mL e conservadas a -20°C para testes posteriores.

A amostra vacinal de parvovírus canino do Laboratório Biovet foi recebida em 13/08/1990 e adquirida do banco de células da American Type Culture Collection (ATCC) (<http://www.atcc.org>) nos Estados Unidos. A cepa utilizada é chamada VR-953™, cepa de Cornell 780916 atenuada, tem sua origem das fezes de cães com enterite hemorrágica, foi depositada por Carmichael (1981) e adaptada em células primárias e secundárias de rim canino. A cepa produz efeito citopático *in vitro* em cultura de tecidos como célula epitelial renal de gato (CRFK).

4.2. Célula epitelial renal de gato (CRFK)

Um frasco de cultura celular (75 cm²) contendo a linhagem de células felinas epiteliais renais “Crendell Feline Kidney Cells” (CRFK) foi cedido pelo Laboratório Biovet e a partir desse frasco foi feita uma subcultura celular.

Para a expansão celular foram utilizados frascos descartáveis de cultura celular (TPP®). A manutenção e expansão das células foram conduzidas de acordo com as recomendações da American Type Culture Collection (ATCC).

Foram adicionados 3 mL de solução de deslocamento com a cultura celular recebida inicialmente para o subcultivo celular. Posteriormente as células que descolaram da monocamada do frasco de cultura celular foram passadas para um tubo de centrifuga e centrifugado a 2000 rpm durante 10 min. O sobrenadante presente no tubo foi descartado e o precipitado foi suspenso em novo meio de cultura.

As culturas foram subdivididas (passagens) em novos frascos antes de atingir confluência. Ao ser atingida a confluência as células foram divididas em tubos crioprotetores (2x10⁶ células a cada 2mL) e mantidas a -70 °C.

O subcultivo e as incubações foram realizados em estufa (Thermo Electron) a 37 °C e 5% de CO₂, enquanto toda manipulação celular foi feita em cabine de segurança biológica. Dessa forma a seguinte linhagem celular utilizada foi:

-CRFK (número na ATCC: CCL-94™) cultivada em meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco), suplementada com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cellgro) e incubada a 37 °C, o que possibilitou a aderência celular dessa linhagem. Como meio de descolamento foram utilizados 0,25% tripsina e 0,02% de EDTA e como meio para preservação das células ao congelamento utilizou-se 5% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) em DMEM.

A concentração final de células foi de 1x10⁶ células /ml. As células foram mantidas no freezer a – 80 °C para utilização nos experimentos seguintes.

4.3. Replicação viral

A replicação do parvovírus canino (CPV) foi realizada no Laboratório Especial Piloto de Pesquisa e Desenvolvimento de Imunobiológicos Veterinários do Instituto Butantan.

Inicialmente a CRFK na concentração final de 1x10⁶ células /ml foi descongelada e cultivada em meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco), suplementada com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cellgro) e incubada a 37°C e 5% de CO₂, possibilitando a aderência celular dessa linhagem e crescimento celular.

Após o crescimento celular (90 – 95%), foi retirado o meio de cultura e colocado 0,5 mL da amostra vacinal e 0,5 mL do meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco), sem suplementação e o frasco celular incubado a 37°C por 1 hora. Após 1 hora foi retirado novamente o meio líquido e colocado o meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco), suplementado com 5% de SFB e incubado a 37°C e 5% de CO₂.

O meio existente no frasco celular quando acidificado pelo lactato (coloração amarelada) era retirado, guardado e trocado por um novo. O meio retirado teve seu pH ajustado para 7,2 com ácido acético.

As células foram observadas por 96 horas para visualização do efeito citopático (ECP). No final dessas 96 horas o meio retirado que teve seu pH

ajustado foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm com o tubo de ultrafiltração Vivaspin 15, constituído por uma membrana de 10,000 MWCO PES (Sartorius Stedim Biotech/Germany).

Após a centrifugação o líquido restante na parte superior do tubo de ultrafiltração foi passado em uma membrana de 0,22 μ M (TPP®) em uma cabine de segurança biológica, aliquotado em microtubos crioprotetores e armazenados a – 80°C, passando esse então a ser a amostra vacinal para a formação da nanopartícula de quitosana.

4.4. Nanopartícula de quitosana

Para a formação da nanopartícula de quitosana foi empregada quitosana (Sigma – Aldrich) de baixo peso molecular, com grau de desacetilação de 75-85%, ácido acético glacial teor de 99,7% (Synth), tripolifosfato de sódio – TPP (Sigma – Aldrich), água milliQ (*Millipore Corporation*), cedido pelo laboratório Biovet. Hidróxido de sódio (NaOH, teor 97,0%, Synth) e o ácido acético glacial (CH₃COOH – Synth) foram utilizados para ajustar o pH das soluções.

Foram preparadas duas soluções distintas utilizando-se água milliQ: a primeira solução contendo ácido acético a 1% e quitosana na concentração de 2mg/ml e a segunda solução com TPP 1mg/ml, na qual foi adicionada a amostra vacinal na concentração aproximada de 0,160mg/ml.

A solução contendo quitosana (2mg/ml) foi colocada em um béquer e permaneceu sob agitação magnética a 850 rotações por minuto (RPM) durante 10 minutos. A solução de TPP 1mg/ml com o antígeno na concentração de 0,160 mg/ml também foi colocada sob agitação magnética durante 3 minutos (apenas para homogeneizar a solução).

Importante ressaltar que todo o processo ocorreu em temperatura ambiente, as soluções tanto de TPP como a de quitosana têm seus pHs corrigidos com o NaOH e ácido acético e o cálculo para adição da solução de TPP por gotejamento na solução de ácido acético foi feita na proporção 3:1 quitosana / TPP (massa /massa).

Com as soluções prontas, obteve-se as são misturas para que ocorra o processo de geleificação iônica. A solução com TPP é gotejada (velocidade de 1 gota a cada 2 segundos) na solução contendo quitosana, a qual permanece

sob agitação magnética durante todo o processo e após a finalização do gotejamento por mais 60 minutos.

4.5. Caracterização da nanopartícula

Finalizado o processo de geleificação iônica a solução é analisada. O analisador de tamanho de partículas *N4 Plus Submicron®* (Beckman Coulter) do Departamento de Engenharia Química foi utilizado para determinar o tamanho médio das partículas e índice de polidispersão. A espectroscopia de correlação de fótons (ou difusão dinâmica da luz) é a técnica utilizada pelo aparelho para determinar o perfil do tamanho médio das partículas.

Para a leitura utilizou-se uma cubeta de quartzo (capacidade: 3,5 ml), na qual foram colocados 1,0 ml da amostra desejada e 2,5 ml de água milliQ.

4.6. Dosagem de proteínas (kit de ensaio de proteína micro BCA)

O kit de Ensaio de Proteína BCA – Ácido Bi-cinconínico é um método simples, rápido e preciso para a detecção e quantificação colorimétrica de proteínas totais. Esse kit foi utilizado em dois momentos:

- Avaliar a concentração de proteína na amostra vacinal.
- Após a caracterização da nanopartícula pelo *N4 Plus Submicron®* (Beckman Coulter) a solução que passou pelo processo de geleificação iônica foi centrifugada durante 30 minutos a uma rotação de 10000 rpm, a uma temperatura de 5°C, para que ocorresse a sedimentação. Assim o sobrenadante foi avaliado para dosar a quantidade existente de proteína na solução final da nanopartícula. A taxa de associação do antígeno à nanopartícula é determinada pelo total de antígenos aplicado na solução menos o resultado da quantidade de antígenos existentes no sobrenadante proveniente da centrifugação das suspensões.

O espectrofotômetro, com comprimento de onda de 562nm, foi o instrumento que permitiu a análise dos resultados obtidos.

4.7. Liofilização

A liofilização foi realizada em um liofilizador Liotop (Modelo L101). Foram colocados 50µL em 10 poços de uma placa de 96 poços do produto final da nanopartícula líquida. A placa de 96 poços foi congelada a - 65°C durante 1 hora antes de ser transferida para o liofilizador. O processo de liofilização teve duração de 24 horas e foi submetido a um vácuo de 156 µHg, secagem feita a 10°C e a temperatura do condensador se manteve a - 42°C.

4.8. Animais utilizados

Vinte e quatro camundongos machos BALB/c, provenientes da Divisão da Produção do Biotério do Instituto de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, foram cedidos depois da aprovação do comitê de bioética para experimentação em animal.

A escolha dessa linhagem de camundongos deve-se ao fato de serem isogênicos (possuem a mesma constituição gênica), diminuindo assim uma variante nos resultados.

4.9. Resposta imunológica *in vivo*

Os camundongos neonatos machos foram divididos em 4 grupos com 6 animais cada e tiveram livre acesso à comida e água:

grupo 1: nanopartícula liofilizada de quitosana mais amostra vacinal.

grupo 2: nanopartícula não liofilizada de quitosana mais amostra vacinal.

grupo 3: amostra vacinal.

grupo 4: controle negativo solução salina.

Foram realizadas 4 imunizações, sendo 3 imunizações sublinguais e 1 intraperitoneal. No primeiro momento a imunização sublingual (parte ventral da língua) foi feita um dia após o desmame, os camundongos neonatos apresentavam 21 dias e pesavam aproximadamente 11 g.

A segunda imunização foi feita nos animais ainda filhotes com 38 dias de idade (15 dias após a primeira imunização), pesando aproximadamente 20 g.

A terceira imunização foi realizada com os camundongos já adultos, com aproximadamente 4 meses de idade.

A administração dos produtos finais foi feita com os animais sedados. Utilizou-se quetamina e xilazina, 100 e 10 mg/kg, diluídas em solução salina por via intraperitoneal (IP).

Foi colocado na parte sublingual no máximo 10µl dos produtos finais de constituição líquida e no máximo 15µg do produto final liofilizado.

FIGURA 5. Imunização sublingual (Imagem: Fernanda Abdulack Lopes)

Para a imunização intraperitoneal não foi necessário sedar os animais. Essa última imunização foi realizada 15 dias após a terceira imunização sublingual, onde foi inoculado 5 µg da amostra vacinal nos 4 grupos de camundongos.

4.10. Coleta de material biológico (sangue e saliva)

Para a coleta de sangue e saliva dos camundongos esperou-se 15/16 dias após a primeira e a segunda imunização. Assim a primeira coleta de sangue e saliva foi feita aos 36/37 dias de idade dos animais e a segunda coleta aos 53/54 dias de idade.

Na terceira imunização, assim como na imunização intraperitoneal com os camundongos já adultos esperou-se apenas 7/8 dias após a administração para a realização da coleta de sangue e saliva.

O sangue foi coletado pela veia submandibular, transferido para um microtubo estéril e centrifugado por 15 minutos a 10000 rpm.

Uma vez formado os coágulos o soro foi removido e mantido congelado a -20°C até sua utilização para o teste de ELISA.

Para a coleta de saliva, a salivação foi induzida com a administração de 0,02 mL de uma solução estéril injetável de cloridrato de pilocarpina (PILOCARPINA CALBOS – 0,10g / 10 mL), e por via intraperitoneal. A saliva foi coletada com pipeta, armazenada em microtubos e armazenada a - 80°C até a sua utilização para posteriores testes.

4.11. ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

A detecção dos anticorpos IgG provenientes do soro e de IgA da saliva, foram testados pelo método de ELISA.

O teste de ELISA é conhecido por ser um teste imunoenzimático que permite a detecção de anticorpos. Baseia-se na reação antígeno-anticorpo detectável através de reações enzimáticas. O método realizado foi o teste de ELISA indireto, tendo como objetivo verificar IgG específica e IgA secretora total.

4.11.1 ELISA para determinação do título de IgG específica

Microplacas de 96 cavidades (NUNC™, Brand Products, EUA) foram sensibilizadas com a amostra vacinal, diluída em tampão carbonato-bicarbonato, 0,1M, pH 9,6 na concentração de 5µg/ml. Foram colocados em cada cavidade 100 µl da amostra e incubado em geladeira a 4°C *overnight*. As cavidades livres foram bloqueadas com 100µl, por duas horas em estufa (37°C), com uma solução de albumina em tampão carbonato-bicarbonato, 0,1M, pH 9,6.

Após a adição de 100 µl das diluições em série dos soros de camundongos e incubação a 37°C por duas horas, foi empregado anticorpo de

cabra anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma). Como substrato utilizou-se OPD (*o-phenylenediamine dihydrochloride*) e peróxido de hidrogênio em tampão citrato. A microplaca foi deixada no escuro à temperatura ambiente e a reação foi interrompida após 20 minutos, através da adição de 50 µl de solução de H₂SO₄ (2,5M) em cada cavidade. Por fim a leitura da placa foi feita em um leitor de ELISA, com filtro de 492nm.

4.11.2 ELISA para determinação do título de IgA secretora total

Microplacas de 96 cavidades (NUNC™, Brand Products, EUA) foram sensibilizadas com IgA α (chain specific affinity isolated antigen specific antibody developed in sheep), diluída em tampão carbonato-bicarbonato, 0,1M, pH 9,6. Foram colocados em cada cavidade 100 µl da amostra e incubado em geladeira a 4°C *overnight*. As cavidades livres foram bloqueadas com 100µl, por duas horas em estufa (37°C), com uma solução de albumina em tampão carbonato-bicarbonato, 0,1M, pH 9,6.

Após a adição de 100 µl das diluições em série das salivas dos camundongos e incubação a 37°C por duas horas, foi empregado anticorpo anti-IgA de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma). Como substrato utilizado-se OPD (*o-phenylenediamine dihydrochloride*) e peróxido de hidrogênio em tampão citrato. A microplaca foi deixada no escuro à temperatura ambiente e a reação foi interrompida após 10 minutos, através da adição de 50 µl de solução de H₂SO₄ (2,5M) em cada cavidade. Por fim a leitura da placa foi feita em um leitor de ELISA, com filtro de 492nm.

4.12. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) é um instrumento usado rotineiramente para a análise microestrutural de materiais sólidos. Para a análise as amostras não liofilizadas precisavam estar secas e para que isso fosse possível elas foram colocadas em estufa 37°C durante 5 minutos. O primeiro trabalho reconhecido descrevendo o conceito de um MEV é o de Knoll (KNOLL,1935). O MEV foi utilizado para avaliar a estrutura superficial da amostra vacinal e a amostra da nanopartícula com a amostra vacinal líquida e

liofilizada. O procedimento foi realizado no Instituto de Química da USP (Central Analítica).

4.13. Métodos estatísticos

Para avaliar a resposta imune de IgA total e IgG específica entre as médias dos quatro grupos de camundongos foi empregado o teste *t* de Student.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Concentração de proteína na amostra vacinal

A quantificação de proteína total foi essencial para a preparação posterior da nanopartícula com a amostra replicada em células CRFK, uma vez que a amostra vacinal ao ser colocada no processo de geleificação iônica deve estar na concentração adequada para que ocorra o mínimo de variação.

O teste de micro BCA (0,5 µg – 30 µg/mL) foi realizado tanto na amostra do vírus atenuado cedido pelo Laboratório Biovet quanto na amostra que foi replicada em células CRFK, concentrada e utilizada para a preparação das nanopartículas.

A amostra de CPV 2 atenuado cedido pelo Laboratório Biovet através da leitura pelo espectrofotômetro obteve um resultado de aproximadamente 1000 µg/ml de proteína.

O teste de micro BCA realizado na amostra vacinal replicada em células CRFK, obteve um resultado de aproximadamente 3900 µg/ml de proteína. A partir desses resultados a nanopartícula foi feita somente com a amostra vacinal replicada em célula CRFK. A leitura da placa foi feita em espectrofotômetro operando no comprimento de onda de 562nm.

Figura 6. Resultado do teste de micro BCA, onde os poços A1/A2/A3/A4/A5 e A6 representam o controle do teste (branco). Os poços B1/B2 e B3 foram colocadas a proteína

padrão (Proteína Sérica Bovina-BSA/ Sigma-Aldrich) e nos poços B4/B5 e B6 estão a amostra vacinal replicada em células CRFK. Tanto a proteína padrão como a amostra vacinal foram submetidas à diluição seriada nos poços seguintes.

5.2. Nanopartículas de quitosana

A metodologia de geleificação iônica aplicada para a obtenção de soluções de nanopartículas (NP) de quitosana (MORRIS *et al.*, 2011) mostrou-se eficiente após a análise de determinação do tamanho da partícula e sua polidispersão obtidos pelo aparelho *N4 Plus Submicron Particle Size Analyzer*.

A leitura das nanopartículas de quitosana foi feita logo depois do processo de geleificação iônica. Para cada imunização sublingual foram feitas 2 nanopartículas de quitosana, sendo uma delas destinada ao processo de liofilização.

Os resultados como tamanho médio (TM) e índice de polidispersão (IDP) das nanopartículas da primeira, segunda e terceira imunização são observados nas tabelas abaixo:

TABELA 1. Resultados do tamanho médio (TM) e IDP da nanopartícula de quitosana com amostra vacinal. Primeira imunização. A solução de quitosana apresentou um pH 5,00 e a solução de TPP pH 9,10. As soluções finais obtidas pelo método de geleificação iônica foram avaliadas pelo aparelho *N4 Plus Submicron Particle Size Analyzer*. (* Destinada ao processo de liofilização).

Experimentos	Nanopartícula com amostra vacinal		Nanopartícula com amostra vacinal*	
	TM	IDP	TM	IDP
Leitura	163,8	0,490	164,4	0,530

TABELA 2. Resultados do tamanho médio (TM) e IDP da nanopartícula de quitosana com amostra. Segunda imunização. A solução de quitosana apresentou um pH 5,00 e a solução de TPP pH 9,10. As soluções finais obtidas pelo método de geleificação iônica foram avaliadas pelo aparelho *N4 Plus Submicron Particle Size Analyzer*. (* Destinada ao processo de liofilização).

Experimentos	Nanopartícula com amostra vacinal		Nanopartícula com amostra vacinal*	
	TM	IDP	TM	IDP
Leitura	157,7	0,410	162,4	0,480

TABELA 3. Resultados do tamanho médio (TM) e IDP da nanopartícula de quitosana com amostra vacinal. Terceira imunização. A solução de quitosana apresentou um pH 5,00 e a solução de TPP pH 9,10. As soluções finais obtidas pelo método de geleificação iônica foram avaliadas pelo aparelho *N4 Plus Submicron Particle Size Analyzer*. (* Destinada ao processo de liofilização).

Experimentos	Nanopartícula com amostra vacinal		Nanopartícula com amostra vacinal*	
	TM	IDP	TM	IDP
Leitura	153,6	0,430	154,4	0,530

5. 3. Dosagem de proteína

Após a centrifugação o teste de micro BCA foi realizado com os sobrenadantes das soluções finais das nanopartículas da primeira, segunda e terceira imunização para que fosse possível calcular a taxa de associação do antígeno (amostra vacinal).

As tabelas 4, 5 e 6 representam os resultados obtidos com a nanopartícula de quitosana com a amostra vacinal.

TABELA 4. Determinação da quantidade de proteínas no sobrenadante pelo método de micro BCA e cálculos da taxa de associação do antígeno (amostra vacinal) agregado à quitosana, realizados na primeira imunização.

Nanopartícula(NP)	Volume final da solução (ml)	Massa Total (µg)	Massa final no sobrenadante (µg)	Antígeno agregado	Taxa de associação do antígeno (%)
Com amostra vacinal	13	832,0	676,0	156,0	18,75
Com amostra vacinal *	13	832,0	655,0	177,0	21,27

TABELA 5. Determinação da quantidade de proteínas no sobrenadante pelo método de micro BCA e cálculos da taxa de associação do antígeno (amostra vacinal) agregado à quitosana, realizados na segunda imunização.

Nanopartícula(NP)	Volume final da solução (ml)	Massa total (µg)	Massa final no sobrenadante (µg)	Antígeno agregado	Taxa de associação do antígeno (%)
Com amostra vacinal	13	832,0	624,0	208,0	25,0
Com amostra vacinal *	13	832,0	645,0	187,0	22,47

TABELA 6. Determinação da quantidade de proteínas no sobrenadante pelo método de micro BCA e cálculos da taxa de associação do antígeno (amostra vacinal) agregado à quitosana realizados na terceira imunização.

Nanopartícula(NP)	Volume final da solução (ml)	Massa total (µg)	Massa final no sobrenadante (µg)	Antígeno agregado	Taxa de associação do antígeno (%)
Com amostra vacinal	13	832,0	598,0	234,0	28,15
Com amostra vacinal	13	832,0	617,0	215,0	25,84

Pela leitura da microplaca (espectrofotômetro) constatou-se que a massa final do antígeno (amostra vacinal) no sobrenadante era bastante superior a agregada a nanopartícula de quitosana.

Apesar da NP de QS com CPV 2 não ter apresentado uma taxa de associação alta e ter variado bastante entre elas, o que é bastante comum na preparação de produtos biológicos, o seu uso para a inoculação em camundongos foi satisfatório, uma vez que para a inoculação sublingual foi necessário 20µg do antígeno para cada camundongo. O precipitado da NP de QS com CPV 2 foi diluída em água milliQ para que alíquotas de 10µl contivessem 20µg do antígeno.

5.4 Liofilização

O processo de liofilização mostrou-se adequado para a obtenção de um produto final seco (PITOMBO, 2005) e teve duração de 24 horas. Após esse período as amostras estavam prontas para serem administradas via sublingual. O processo de liofilização não foi efetuado com os parâmetros necessários para uma prospecção em larga escala. Os parâmetros utilizados são os mesmos descritos em bibliografias com partícula de quitosana. A mucosa sublingual apresenta uma grande superfície de absorção com alta vascularidade o que garante uma absorção rápida da substância desejada (KWEON, 2011).

A quitosana já é considerada um polímero mucoadesivo (AMIDI *et al.*, 2010), porém após passar pelo processo de liofilização ocorre uma facilitação na administração do produto final, uma vez que a interação com a mucosa foi melhorada (ASANE *et al.*, 2008).

FIGURA 7. Resultado final do processo de liofilização.

5.5. Microscopia eletrônica de varredura

Com o microscópio eletrônico observou-se as características microestruturais de cada amostra desejada. Verificou-se que o vírus CPV 2, replicado em células CRFK, aparecem em grande quantidade e que as partículas do CPV-2 são esféricas, com o diâmetro menor de 35 nm (TSAO *et al.*, 1991). Além disso, após o processo de centrifugação e liofilização a que foram submetidas as nanopartículas de quitosana com o CPV 2, constatou-se pela MEV que houve uma adequação estrutural das nanopartículas. As amostras de nanopartículas se transformaram em uma estrutura fibrosa coloidal denominada hidrogel (Figuras 9 e 10).

FIGURA 8. Microscopia eletrônica de varredura da amostra vacinal (aumento de 20000 x).

FIGURA 9. Microscopia eletrônica de varredura mostrando estruturas nanoparticuladas da amostra líquida formando agregados. Após a centrifugação o precipitado formou um hidrogel de quitosana (aumento de 20000 x)

FIGURA 10. Microscopia eletrônica de varredura da amostra liofilizada mostrando a formação de um hidrogel (aumento de 20000 x).

5.6. Análise da atividade imunológica

O estudo realizado de antigenicidade levou à resposta imune humoral e de mucosa de camundongos neonatos e adultos com a amostra vacinal, controle negativo, hidrogel de quitosana líquido e liofilizado. Para essa finalidade foi utilizado o teste de ELISA.

5.6.1 Ensaio imunoenzimático para a titulação de anticorpos de IgA secretora presente na saliva não específica.

Os resultados estão representados por meio das FIGURAS 11,12,13 e 14 e nas TABELAS 7,8,9 e 10 , que representam os índices de significância dos títulos obtidos na resposta imune por imunização sublingual para a IgA total obtida da saliva dos camundongos.

FIGURA 11. Resposta imune para a IgA total presente na saliva de camundongos BALB/c após 1ª imunização por via sublingual. Camundongos imunizados com a amostra vacinal (AV), hidrogel líquido (HLiq), hidrogel liofilizado (HLiof) e controle negativo (CN). Existe uma diferença significativa entre as colunas que possuem a mesma letra.

TABELA 7. Valores de $*P$ para nível de significância de 0,05 da resposta imune de mucosa para a IgA total de camundongos imunizados com amostra vacinal, nanopartícula líquida, nanopartícula liofilizada e controle negativo. A comparação entre os tratamentos foi realizada pelo teste t de Student.

Tratamento	Valor de P
AV x HLiq	$P > 0,9$
AV x HLiof	$*P < 0,001$
AV x CN	$0,05 < P < 0,1$
HLiq x HLiof	$*P < 0,001$
HLiq x CN	$0,1 < P < 0,2$
HLiof x CN	$*P < 0,001$

Nota: Amostra vacinal (AV) / Hidrogel líquido (HLiq) / Hidrogel liofilizado (HLiof) / Controle negativo (CN).

FIGURA 12. Resposta imune para a IgA total presente na saliva de camundongos BALB/c após 2ª imunização por via sublingual. Camundongos imunizados com a amostra vacinal (AV), hidrogel líquido (HLiq), hidrogel liofilizado (HLiof) e controle negativo (CN). Existe uma diferença significativa entre as colunas que possuem a mesma letra.

TABELA 8. Valores de $*P$ para nível de significância de 0,05 da resposta imune de mucosa para Ig A total de camundongos imunizados com amostra vacinal, nanopartícula líquida, nanopartícula liofilizada e controle negativo. A comparação entre os tratamentos foi realizada pelo teste t de Student.

Tratamento	Valor de P
AV x HLiQ	$*P < 0,001$
AV x HLiof	$*P < 0,001$
AV x CN	$*P < 0,001$
HLiQ x HLiof	$*P < 0,001$
HLiQ x CN	$0,2 < P < 0,1$
HLiof x CN	$*P < 0,001$

Nota: Amostra vacinal (AV) / Hidrogel líquido (HLiQ) / Hidrogel liofilizado (HLiof) / Controle negativo (CN).

FIGURA 13 Resposta imune para a IgA total presente na saliva de camundongos BALB/c após 3ª imunização por via sublingual. Camundongos imunizados com a amostra vacinal (AV), hidrogel líquido (HLiQ), hidrogel liofilizado (HLiof) e controle negativo (CN). Existe uma diferença significativa entre as colunas que possuem a mesma letra.

TABELA 9. Valores de $*P$ para nível de significância de 0,05 da resposta imune de mucosa para a Ig A total de camundongos imunizados com amostra vacinal, nanopartícula líquida, nanopartícula liofilizada e controle negativo. A comparação entre os tratamentos foi realizada pelo teste t de Student..

Tratamento	Valor de P
AV x HLiq	$0,05 < P < 0,1$
AV x HLiof	$*P < 0,001$
AV x CN	$*P < 0,001$
HLiq x HLiof	$*P < 0,001$
HLiq x CN	$*P < 0,001$
HLiof x CN	$*P < 0,001$

Nota: Amostra vacinal (AV) / Hidrogel líquido (HLiq) / Hidrogel liofilizado (HLiof) / Controle negativo (CN).

FIGURA 14. Resposta imune para IgA total presente na saliva de camundongos BALB/c após imunização intraperitoneal. Grupos de camundongos imunizados com a amostra vacinal (AV), hidrogel líquido (HLiq), hidrogel liofilizado (HLiof) e controle negativo (CN). Existe uma diferença significativa entre as colunas que possuem a mesma letra.

TABELA 10. Valores de $*P$ para nível de significância de 0,05 da resposta imune de mucosa para a Ig A total de camundongos imunizados intraperitoneal com amostra vacinal. A comparação entre os tratamentos foi realizada pelo teste t de Student.

Tratamento	Valor de P
AV x HLiq	$*P < 0,001$
AV x HLiof	$*P < 0,001$
AV x CN	$*P < 0,001$
HLiq x HLiof	$*P < 0,001$
*HLiq x CN	$*P < 0,001$
HLiof x CN	$*P < 0,001$

Nota: Amostra vacinal (AV) / Hidrogel líquido (HLiq) / Hidrogel liofilizado (HLiof) / Controle negativo (CN).

FIGURA 15. Cinética da produção de IgA da saliva dos camundongos imunizados com amostra vacinal (AV), hidrogel de quitosana líquida (HLiq), hidrogel de quitosana liofilizada (HLiof) e controle negativo (CN). (Os números 1, 2 e 3 representam respectivamente a resposta obtida na primeira, segunda e terceira imunização).

5.6.2. Ensaio imunoenzimático para a titulação de anticorpos de IgG específico

Os resultados estatísticos estão representados por meio das FIGURAS 16, 17 e 18 nas TABELAS 11,12 e 13, que representam os índices de significância dos títulos obtidos na resposta imune humoral para Ig G específica.

FIGURA 16. Resposta imune humoral para Parvovírus canino em camundongos BALB/c após 2ª imunização por via sublingual. Camundongos imunizados com a amostra vacinal (AV), hidrogel líquido (HLiq), hidrogel liofilizado (HLiof) e controle negativo (CN). Existe uma diferença significativa entre as colunas que possuem a mesma letra.

TABELA 11. Valores de **P* para nível de significância de 0,05 da resposta imune humoral para Ig G específica de camundongos imunizados com a amostra vacinal, nanopartícula líquida, nanopartícula liofilizada e controle negativo comparados por teste *t* de Student .

Tratamento	Valor de <i>P</i>
AV x HLiq	0,8 < <i>P</i> < 0,9
AV x HLiof	0,05 < <i>P</i> < 0,02
AV x CN	0,02 < <i>P</i> < 0,05
HLiq x HLiof	0,05 < <i>P</i> < 0,01
HLiq x CN	0,02 < <i>P</i> < 0,05
HLiof x CN	* <i>P</i> < 0,01

Nota: Amostra vacinal (AV) / Hidrogel líquido (HLiq) / Hidrogel liofilizado (HLiof) / Controle negativo (CN)

FIGURA 17. Resposta imune humoral para Parvovírus canino em camundongos BALB/c após 3ª imunização por via sublingual. Camundongos imunizados com a amostra vacinal (AV), hidrogel líquido (HLiq), hidrogel liofilizado (HLiof) e controle negativo (CN). Existe uma diferença significativa entre as colunas que possuem a mesma letra.

TABELA 12 Valores de P para nível de significância de 0,05 da resposta imune humoral para Ig G específica de camundongos imunizados com amostra vacinal, nanopartícula líquida, nanopartícula liofilizada e controle negativo comparados por teste t de Student.

Tratamento	Valor de P
AV x HLiq	$0,1 < P < 0,2$
AV x HLiof	$P < 0,05$
AV x CN	$0,05 < P < 0,02$
HLiq x HLiof	$*P < 0,001$
HLiq x CN	$0,1 < P < 0,2$
HLiof x CN	$*P < 0,001$

Nota: Amostra vacinal (AV) / Hidrogel líquido (HLiq) / Hidrogel liofilizado (HLiof) / Controle negativo (CN).

FIGURA 18. Resposta imune humoral para Parvovírus canino em camundongos BALB/c após imunização por intraperitoneal. Grupos de camundongos imunizados com a amostra vacinal (AV), hidrogel líquido (HLiq), hidrogel liofilizado (HLiof) e controle negativo (CN). Existe uma diferença significativa entre as colunas que possuem a mesma letra.

TABELA 13. Valores de $*P$ para nível de significância de 0,05 da resposta imune humoral para Ig G específica de camundongos imunizados intraperitoneal com amostra vacinal comparados por teste t de Student.

Tratamento	Valor de P
AV x HLiq	$*P < 0,001$
AV x HLiof	$*P < 0,001$
AV x CN	$*P < 0,001$
HLiq x HLiof	$*P < 0,001$
HLiq x CN	$0,7 < P < 0,8$
HLiof x CN	$*P < 0,001$

Nota: Amostra vacinal (AV) / Hidrogel líquido (HLiq) / Hidrogel liofilizado (HLiof) / Controle negativo (CN).

Os efeitos imunológicos nos camundongos adultos já foram de certa forma descritos, porém em camundongos imaturos (menos de 45 dias de vida) não existe nenhum trabalho descrevendo tais efeitos.

A primeira imunização foi realizada quando os camundongos estavam com apenas 21 dias de idade, ou seja, apenas um dia após o desmame. Nessa primeira imunização não houve resposta na produção de IgG específica em nenhum dos grupos, porém foi possível observar um aumento da produção de IgA total na saliva no grupo que foi imunizado com o hidrogel liofilizado.

Na segunda imunização os camundongos estavam com 38 dias. Nessa imunização houve tanto uma produção de IgA secretora na saliva como produção de IgG específica para o CPV2. O grupo de camundongos que recebeu o hidrogel liofilizado aumentou a produção de IgA e IgG específica. Já o grupo que recebeu a amostra vacinal aumentou apenas a produção de IgA.

Novamente o grupo com hidrogel liofilizado obteve a melhor resposta no período conhecido como lacuna imunológica, onde o status imunológico é considerado imaturo e há efeitos de bloqueio dos anticorpos transferidos passivamente pela mãe (MOREIN *et al.*, 2002).

Desse modo demonstrou-se que a propriedade mucoadesiva da quitosana, melhorada pelo processo de liofilização é uma característica importante para a entrega de uma vacina via sublingual.

O hidrogel liofilizado se manteve por mais tempo na mucosa sublingual, uma vez que houve aderência. A limitação de uma resposta imunológica em uma idade precoce pode ser superada pela administração de adjuvantes concomitantemente ao antígeno vacinal, porém nesse caso, além da propriedade adjuvante da quitosana, a sua propriedade mucoadesiva tornou-se importante para o desenvolvimento de uma vacina de mucosa (DE MAGISTRIS, 2006; JÓNSDÓTTIR, 2007).

Já na última imunização os camundongos estavam adultos, com aproximadamente 120 dias. O aumento da produção de IgA total da saliva apareceu nos 3 grupos em que se administrou a amostra vacinal, o hidrogel líquido e o hidrogel liofilizado, obtendo-se resposta sistêmica por IgG específica nos grupos de amostra vacinal e hidrogel liofilizado.

A capacidade de um antígeno entregue via sublingual estimular a resposta sistêmica e de mucosa como foi possível constatar a partir da

segunda imunização (ÇUBURU *et al.*, 2007, SONG *et al.*, 2008 CHO *et al.*, 2010; AMUGUNI *et al.*, 2012) já havia sido descrito em outros trabalhos, no entanto todos eles utilizaram camundongos adultos, como foi feito na terceira imunização.

No ensaio quantitativo da cinética de IgA secretora não específica presente na saliva (FIGURA 15), observou-se que o hidrogel liofilizado com o vírus levou com o passar do tempo a um aumento expressivo da resposta imune em relação aos outros grupos mostrando, que a mucoadesividade é um fator importante. Também notou-se que com o passar do tempo os animais vão apresentando *um status* imunológico mais maduro.

Nas imunizações intraperitoneais observou-se que o próprio vírus sensibilizou maior quantidade de células efectoras da resposta imune.

Os parvovírus, incluindo o CPV-2, são estáveis e resistentes às influências ambientais e podem resistir às variações de pH (3.0 a 9.0) e temperatura (SIEGL, 1984). A amostra vacinal e o hidrogel líquido podem ter sido deglutidos, já que a deglutição é um movimento involuntário, porém a amostra vacinal estava cheia de vírus atenuado, os quais podem ter resistido ao pH estomacal. Assim abre a possibilidade de ter ocorrido uma imunização pela mucosa intestinal.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

- Observou-se uma resposta imune sistêmica e de mucosa desenvolvida por um mecanismo de entrega sublingual do antígeno do CPV 2 apenas após a segunda imunização.
- Desenvolveu-se um mecanismo de entrega sublingual com o antígeno do CPV 2
- Houve aumento da produção de Ig A secretora total a partir da primeira imunização
- Houve resposta imune sistêmica por IgG específico a partir da segunda imunização.
- A mucoadesividade é importante para o reconhecimento de patógenos e desenvolvimento de uma resposta imune efetiva.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**, 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S.; FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 15, p. 1688-1713, 2006.

ACTOR, J. K. **Imunologia e Microbiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 184p, 2007.

AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 100, n. 1, p. 5-28, 2004.

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.

AMORIJ, J.-P.; HINRICHS, W.L.; FRIJLINK, H.W.; WILSCHUT, J.C.; HUCKRIEDE, A. Needle-free influenza vaccination. **The Lancet Infectious Diseases**, v.10, p.699-711, 2010.

AMORIJ, J.- P.; KERSTEN, G.F.A.; SALUJA, V.; TONNIS, W. F.; HINRICHS, W.L.J.; SLÜTTER, B.; BAL, S.M.; BOUWSTRA, J.A.; HUCKRIEDE, A.; JISKOOT, W. Towards Tailored Vaccine Delivery: Needs, Challenges and Perspectives. **Journal of Controlled Release**, p.1-14, 2012a.

AMUGUNI, H.; LEE, S.; KERSTEIN, K.; BROWN, D.; BELITSKY, B.; HERRMANN, J.; KEUSCH, G.; SONENSHEIN, A.; TZIPORI, S. Sublingual immunization with an engineered *Bacillus subtilis* strain expressing tetanus toxin fragment C induces systemic and mucosal immune responses in piglets. **Microbes and Infection**, v.14, p. 447-56, 2012.

ANACAK, Y.; MILLER, R. C.; CONSTANTINOU, N.; *et al.* Primary Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma of the Salivary Glands: A Multicenter Rare Cancer Network Study. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, v. 82, p. 315 – 320, 2012.

APPEL, M.; SCOTT, F.; CARMICHAEL, L. Isolation and immunization studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. **Veterinary Record**, v. 105, n.8, p. 156 – 159, 1979.

ASANE, G.S.; NIRMAL, S.A.; RASAL, K.B.; NAIK, A.A.; MAHADIK, M.S.; RAO, Y.M. Polymers for mucoadhesive drug delivery system: a current status. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 34, p. 1246–66, 2008.

AZIZ, M. A.; MIDHA, S.; WAHEED, S. M.; BHATNAGAR, R. Oral vaccines: new needs, new possibilities. *BioEssays*, v. 29, n. 6, p. 591-604, 2007.

BAUMANN, J. PARK, C. G.; MANTIS, N. J. Recognition of secretory IgA by DC-SIGN: Implications for immune surveillance in the intestine. **Immunology Letters**, v. 131, n. 1, p. 59-66, 2010

BINN, L.; LAZAR, E.; EDDY, G.; KAJIMA, M. Recovery and characterization of a minute virus of canines. **Infection and Immunity**, v.1, p. 503 – 508, 1970.

BORGES, O.; TAVARES, J.; DE SOUSA, A.; BORCHARD, G.; JUNGINGER, H.E.; CORDEIRO-DA-SILVA, A. Evaluation of the immune response following a short oral vaccination schedule with hepatitis B antigen encapsulated into alginate-coated chitosan nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 4-5, p. 278-290, 2007.

BRANDTZAEG, P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5467-5484, 2007

BRANDTZAEG, P. The Mucosal Immune System and Its Integration with the Mammary Glands. **The Journal of Pediatrics**, v. 156, n. 2, Supplement 1, p. S8-S15, 2010.

BUONAVOGLIA, C.; MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; TEMPESTA, M.; CAVALLI, A.; BUONAVOGLIA, D.; BOZZO, G.; ELIA, G.; DECARO, N.; CARMICHAEL, L. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. **Journal of General Virology**, v. 82, n. 12, p. 3021-3025, 2001.

CARMICHAEL, L.; BINN, L. New enteric viruses in the dog. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v. 25, p. 1- 37, 1981.

CARPENTER, J. F.; PIKAL, M. J.; CHANG, B. S.; RANDOLPH, T. W. Rational design of stable lyophilized protein formulations: some practical advice. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 8, p. 969-975, 1997.

CHACÓN, M.; MOLPECERES, J.; BERGES, L.; GUZMÁN, M.; ABERTURAS, M. R. Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(lactide-glycolide) carriers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 2, p. 99-107, 1999.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, Supplement 2, p. S3-S23, 2010.

CHO, H.-J.; Kim, J.-Y.; LEE Y.; KIM, J.M.; KIM, Y.B.; CHUN, T.; OH, Y.-K. Enhanced humoral and cellular immune responses after sublingual immunization against human papillomavirus 16 L1 protein with adjuvants. **Vaccine**, v. 28, 2598-2606, 2010.

CSABA, N.; KÖPING-HÖGGÅRD, M.; ALONSO, M. J. Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA

delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 382, n. 1-2, p. 205-214, 2009.

COSTANTINO, H. R.; PIKAL, M. J. **Lyophilization of biopharmaceuticals**. Springer, 2004.

COTMORE, S. F.; TATTERSALL, P. DNA replication in the autonomous parvoviruses. **Seminars in Virology**, v. 6, n. 5, p. 271-281. doi: 10.1006/smvy.1995.0033, 1995.

ÇUBURU, N.; KWEON, M.; SONG, J.; ET AL. Sublingual immunization induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice. **Vaccine**, v. 25, n. 51, p. 8598-8610, 2007.

DAY, M. Immune System Development in the Dog and Cat. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n. Supplement 1, p. S10-S15, 2007.

DENNEHY, P. H. Rotavirus vaccines-An update. **Vaccine**, v. 25, n. 16, p. 3137-3141, 2007.

DE MAGISTRIS, M. T. Mucosal delivery of vaccine antigens and its advantages in pediatrics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 1, p. 52-67, 2006.

DESAI, M. P.; LABHASETWAR, V.; WALTER, E.; LEVY, R. J.; AMIDON, G. L. The Mechanism of Uptake of Biodegradable Microparticles in Caco-2 Cells Is Size Dependent. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 11, p. 1568-1573, 1997.

DESARIO, C.; DECARO, N.; CAMPOLO, M.; CAVALLI, A.; CIRONE, F.; ELIA, M.; MARTELLA, V.; LORUSSO, E.; CAMERO, M.; BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus? **Journal of Virological Methods** 126, 179-185, 2005.

DIETRICH, G.; GRIOT-WENK, M.; METCALFE, I. C.; LANG, A. B.; VIRET, J. Experience with registered mucosal vaccines. **Vaccine**, v. 21, n. 7-8, p. 678-683, 2003.

EDSMAN, K.; HAGERSTROM, H. Pharmaceutical applications of mucoadhesion for the non-oral routes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.57, p. 3–22, 2005.

FENNER, F.; BACHMANN, P. A.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A.; STUDDERT, M. J.; WHITE, D. O. *Virología Veterinaria*. **Editora Acribia**, 691p., 1992.

FRANKS, F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, n. 3, p. 221-229, 1998.

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.

GODDARD, A.; LEISEWITZ, A. L. Canine Parvovirus. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 40, n. 6, p. 1041-1053, 2010.

GREENE, C. E.; **Infectious Diseases of the Dog and Cat**, 3^o edition, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, U.S.A., 2006.

HAGIWARA, M. K.; JULY, J. R.; BACCARO, M. R.; ANGELO, M. J. O. Enterite hemorrágica em cães associada à infecção por um parvovirus. **Arquivos do Instituto Biológico - São Paulo**, v. 47, p. 47-49, 1980.

HARRIS, D. C.; Análise Química Quantitativa, 5^a ed., **LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.**: Rio de Janeiro, 2001.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6: 986-994, 1996.

HILLEMAN, M. R. Vaccines in historic evolution and perspective: a narrative of vaccine discoveries. **Vaccine**, v. 18, n. 15, p. 1436-1447, 2000.

HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nature Medicine**. v.11, p. 45-53, 2005.

HOSKINS, J.D. Update on canine parvoviral enteritis. **Veterinary Medicine**.v. 92(8):p.694–709, 1997.

HUEFFER, K.; PARRISH, C. R. Parvovirus host range, cell tropism and evolution. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 392-398. doi: 10.1016/S1369-5274(03)00083-3, 2003.

JACOBS, R. M.; WEISER, M. G.; HALL, R. L.; KOWALSKI, J. J. Clinicopathologic features of canine parvoviral enteritis. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 16: 809-814, 1980.

JONES,T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**, 6^a ed. Barueri: Manole, cap.8, p.266-273, 2000.

JÓNSDÓTTIR, I. Maturation of Mucosal Immune Responses and Influence of Maternal Antibodies. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n. Supplement 1, p. S20-S26, 2007.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 3-11, 2010.

KELLY, W. An enteric disease of dogs resembling feline panleucopenia. **Australian Veterinary Journal**, v.54, p.593, 1978.

KNOLL, M. Aufladepotential und Sekundäremission elektronenbestrahlter Körper. **ZTech. Phys.** v.16, 467-475, 1935.

KWEON, M. Sublingual mucosa: A new vaccination route for systemic and mucosal immunity. **Cytokine**, v. 54, p. 1-5, 2011.

LAMM, C. G.; REZABEK, G. B. Parvovirus Infection in Domestic Companion Animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 38, n. 4, p. 837-850, 2008.

LEBIEN, T. W.; TEDDER, T. F. B lymphocytes: how they develop and function. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1570-1580, 2008.

LEMIALE, F.; KONG, W.; AKYUREK, L.; LING, X.; HUANG, Y.; CHAKRABARTI, B.; ECKHAUS, M.; NABEL, G. Enhanced mucosal immunoglobulin A response of intranasal adenoviral vector human immunodeficiency virus vaccine and localization in the central nervous system. **Journal of Virology**, v. 77, p.10078 -10087, 2003.

LEVINE, M. M.; KAPER, J. B. Live oral vaccines against cholera: An update. **Vaccine**, v. 11, n. 2, p. 207-212, 1993.

MACKAY, I. M.; MACKAY, J. F.; NISSEN, M. D.; SLOOTS, T. P. Real-time PCR: history and fluorogenic chemistries. In: **Real-time PCR in Microbiology. From diagnosis to characterization**. Mackay, I. M. Academic Press. 464p, 2007.

MACLAUGHLIN, S. Dr. Albert Sabin. **Primary Care Update for OB/GYNs**, v. 10, n. 3, p. 129-130, 2003.

MACPHERSON, A. J. HUNZIKER, L. MCCOY, K.; LAMARRE, A. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 12, p. 1021-1035, 2001.

MANICKAN, E.; YU, Z.; ROUSE, B. T. DNA immunization of neonates induces immunity despite the presence of maternal antibody. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 9, p. 2371-2375, 1997.

MARTELLA, V.; CAVALLI, A.; DECARO, N. *et al.* Immunogenicity of an intranasally administered modified live canine parvovirus type 2b vaccine in pups with maternally derived antibodies. **Clin Diagn Lab Immunol**, p.1243 - 1245, 2005.

MCCLUSKIE, M. J.; DAVIS, H. L. Mucosal immunization with DNA vaccines. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 9, p. 685-698, 1999.

MCVEY, S.; SHI, J. Vaccines in Veterinary Medicine: A Brief Review of History and Technology. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.40, n.3, p. 381 – 392, 2010.

MIMS, C.A.; PLAYFAIR, J.H.; ROITT, I.M.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. **Microbiologia Médica**. São Paulo: Manole Ltda, p. 25.1-25.14, 1995.

MITRAGOTRI, S. Immunization without needles. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 12, p. 905-916, 2005.

MOCHIZUKI, M.; SAN GABRIEL, M. V.; NAKATANI, H.; YOSHIDA, M.; HARASAWA, R. Comparasion of polymerase chain reaction with virus isolation, haemagglutination assays for the detection of canine parvoviruses in faecal specimens. **Research in Veterinary Science**, v. 55, 60-63, 1993.

MOHAN RAJ, J.; MUKHOPADHYAY, H.; THANISLASS, J.; ANTONY, P.; PILLAI, R. Isolation, molecular characterization and phylogenetic analysis of canine parvovirus. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 8, p. 1237-1241. doi: 10.1016/j.meegid.2010.08.005, 2010.

MORAES, M. P.; COSTA, P. R. S. **Virologia Veterinária**. Eduardo Flores, capítulo 14. Santa Maria: Ed. UFSM, 888p, 2007.

MOREIN, B.; ABUSUGRA, I.; BLOMQVIST, G. Immunity in neonates. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 87, n. 3-4, p. 207-213, 2002.

MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P.J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. **Veterinary Virology**, Academic Press, 3 ed., 629p., 1999.

MORRIS, G. A. CASTILE, J. SMITH, A. ADAMS, G. G.; HARDING, S. E. The effect of prolonged storage at different temperatures on the particle size distribution of tripolyphosphate (TPP) - chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 4, p. 1430-1434, 2011.

NCBI / TAXONOMY BROWSER; endereço eletrônico:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi> Acesso em: 15/11/2011.

NEGRI, D. R.; RICCOMI, A.; PINTO, D.; VENDETTI, S.; ROSSI, A.; CICCONI, R.; RUGGIERO, P.; DEL GIUDICE, G.; DE MAGISTRIS, M.T. Persistence of mucosal and systemic immune responses following sublingual immunization. **Vaccine**, v. 28, n. 25, p. 4175-4180, 2010.

NEZLIN, R. **Animal and Human Immunoglobulins**. In: The Immunoglobulins, New York: Academic Press, p.75-121, 1998.

OGRA, P. L. Ageing and its possible impact on mucosal immune responses. **Ageing Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 101-106, 2010.

OHSHIMA, T.; KISHI, M.; MOCHIZUKI, M. Sequence analysis of an Asian isolate of minute virus of canines (canine parvovirus type 1). **Virus Genes**, v. 29, n. 3, p. 291-296. doi: 10.1007/s11262-004-7430-3, 2004.

OIEN, N. L.; BRIDEAU, R. J.; WALSH, E. E.; WATHEN, M. W. Induction of local and systemic immunity against human respiratory syncytial virus using a chimeric FG glycoprotein and cholera toxin B subunit. **Vaccine**, v. 12, n. 8, p. 731-735, 1994.

OTTO, C.M.; DROBATZ, K.J.; SOTER, C. Endotoxemia and tumor necrosis factor activity in dogs with naturally occurring parvoviral enteritis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.11(2), p.65–70, 1997.

PALERMO, L.M.; HAFENSTEIN, S.L.; PARRISH, C.R. Purified Feline and Canine Transferrin Receptors Reveal Complex Interactions with the Capsids of Canine and Feline Parvoviruses That Correspond to Their Host. **Journal of Virology**, v. 80(17), p. 8482-8492, 2006.

PASTORET, P. Challenges and Issues of Early Life Vaccination in Animals and Humans. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n. Supplement 1, p. S2-S3, 2007.

PARRISH, C. R.; TRUYEN, U. Parvovirus Variation and Evolution. In: **Origin and Evolution of Viruses**. London: Academic Press, p.421-439, 1999.

PAVOT, V.; ROCHEREAU, N.; GENIN, C.; VERRIER, B.; PAUL, S. New insights in mucosal vaccine development. **Vaccine**, p.142-54, 2012.

PITOMBO, R. N. M.; Liofilização. In: **Purificação de produtos biotecnológicos**. JUNIOR, A.P.; KILIKIAN, B.V. (org.); editora Manole, SP, p.332 – 349, 2005.

POLLOCK, R.V.; CARMICHAEL, L.E. Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline, and interference with vaccination. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 180, p. 37–42, 1982.

POMARICO, L. DE SOUZA, I. P. R. CASTRO, G. F. B. DE A. et al. Levels of salivary IgA antibodies to *Candida* spp. in HIV-infected adult patients: A systematic review. **Journal of Dentistry**, v. 38, n. 1, p. 10-15, 2010.

POVEY, R. C. Distemper Vaccination of Dogs: Factors Which Could Cause Vaccine Failure. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 27, n. 9, p. 321-323, 1986.

PRABAHARAN, M. Review Paper: Chitosan Derivatives as Promising Materials for Controlled Drug Delivery. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 23, n. 1, p. 5 -36, 2008.

PRATELLI, A.; CAVALLI, A.; MARTELLA, V.; TEMPESTA, M.; DECARO, N.; CARMICHAEL, L.; BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 3, p. 612-615, 2001.

PULENDRAN, B.; AHMED, R. Translating Innate Immunity into Immunological Memory: Implications for Vaccine Development. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 849-863, 2006.

PFIZER VACCINES / Canine Parvovirus – VANGUARD PLUS acesso em 30/08/2012; endereço eletrônico:
<https://animalhealth.pfizer.com/sites/pahweb/US/EN/Products/Pages/CADVaccinesParvo.aspx>.

RASKOVIC, P. Step-by-step process integration method for the improvements and optimization of sodium tripolyphosphate process plant. **Energy**, v. 32, n. 6, p. 983-998, 2007.

REED, A. P.; JONES, E. V.; MILLER, T. J. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. **Journal of Virology**, v. 62 (1), p. 266-276, 1988.

RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C. A.; BLANTON, J.; MANANGAN, J.; MORRILL, P.; MURPHY, S.; NIEZGODA, M.; ORCIARI, L. A.; SCHUMACHER, C.L.; DIETZSCHOLD. Oral vaccination of dogs with recombinant rabies virus SIEGRIST, C. Neonatal and early life vaccinology. **Vaccine**, v. 19, n. 25-26, p. 3331-3346, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 957p, 1989.

SIEGL, G. Canine parvovirus: origin and significance of a “new” pathogen. In: **Berns, K. I. The Parvoviruses New York, Plenum Publishing Corp.**, p. 363-388, 1984.

SIEGRIST, C. Neonatal and early life vaccinology. **Vaccine**, v. 19, n. 25-26, p. 3331-3346, 2001.

SILVA, A.R.. Análise da cinética de replicação do parvovírus canino em cultivo de células CRFK através da PCR em tempo real. 2011. 106 f. Dissertação (Mestrado) – **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo. 2011.

SINGH, M.; VAJDY, M.; GARDNER, J.; BRIONES, M.; O'HAGAN, D. Mucosal immunization with HIV-1 gag DNA on cationic microparticles prolongs gene expression and enhances local and systemic immunity. **Vaccine**, v. 20, n. 3-4, p. 594-602, 2001.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. ; Princípios de Análise Instrumental, 5ª ed., **Bookman**: Porto Alegre, 2002.

SMART, J.D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p.1556-1568, 2005.

SONG, J.H.; NGUYEN, H.H.; ÇUBURU, N.; HORIMOTO, T.; KO, S.Y.; PARK, S.H.; CZERKINSKY, C.; KWEON, M.N. Sublingual vaccination with influenza virus protects mice against lethal viral infection. **PNAS**, p. 1644-9, 2008.

STAATS, H. F.; JACKSON, R. J.; MARINARO, M.; ET AL. Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development. **Current Opinion in Immunology**, v. 6, n. 4, p. 572-583, 1994.

STROMBECK, D.R.; GUILFORD, W.G. **Small animal gastroenterology**. 2.ed. USA: wolfe publishing Limited, p.280-313, 1991.

TAKAHASHI, I.; NOCHI, T.; YUKI, Y.; KIYONO, H. New horizon of mucosal immunity and vaccines. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 3, p. 352-358, 2009.

TAMS, T.R. **Handbook of small animal gastroenterology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, p.246-265, 1996.

THAPA, P.; BAILLIE, A. J.; STEVENS, H. N. E. Lyophilization of Unit Dose Pharmaceutical Dosage Forms. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 29, n. 5, p. 595, 2003.

TOMASI, T.B. The discovery of secretory IgA and the mucosal immune system. **Immunology Today**, 13: 416-418, 1962.

TOMASI, T.B.; TAN E.; SOLOMON, A.; PRENDERGAST, J.C. Characteristic of an immune system common to certain external secretions. **The Journal of Experimental Medicine**, 121: 107-124, 1965.

TRUYEN, U. Evolution of canine parvovirus--a need for new vaccines? **Veterinary Microbiology**, v. 117, n. 1, p. 9-13, 2006.

TSAI, M.; CHEN, R.; BAI, S.; CHEN, W. The storage stability of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles in a phosphate buffer. **Carbohydrate Polymers**, v.84, n. 2, p. 756-761, 2011.

TSAO, J.; CHAPMAN, M.S.; AGBANDJE, M.; KELLER, W.; SMITH, K.; WU, H.; LUO, M.; SMITH, T. J.; ROSSMANN, M. G.; COMPANS, R. W. The three dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. **Science**. 251 (5000), p. 1456-1464, 1991.

TURVEY, S. E.; BROIDE, D. H. Innate immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, Supplement 2, p. S24-S32, 2010.

ULLRICH, S. Skin Immunology and Immunotoxicity. In: **Comprehensive Toxicology**. p.217-234, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B735M-50CM347-4B/2/8e5ea1367f85a97de58a1ed3a2ca1612>>. Acesso em: 18/1/2011

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.

YANG, C.Y.; HSU, C.H.; TSAI, M.L. Effect of crosslinked condition on characteristics of chitosan/tripolyphosphate/genipin beads and their application in the selective adsorption of phytic acid from soybean whey. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 659-665, 2011.

YULE, T. D.; ROTH, M. B.; DREIER, K.; JOHNSON, F. A.; DENSMORE, M. P.; SIMMONS, K.; FANTON, R. Canine parvovirus vaccine elicits protection from the inflammatory and clinical consequences of the disease. **Vaccine**, v. 15, n. 6-7, p. 720-729. doi: 10.1016/S0264-410X(96)00232-0, 1997.

WANER, T.; NAVEH, A.; WUDOVSKY, I.; CARMICHAEL, L.E. Assessment of maternal antibody decay and response to canine parvovirus vaccination using a clinic-based enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.8 (4), p.427-32, 1996.

WANG, W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 203, n. 1-2, p. 1-60, 2000.

WHEELER, A. W.; SHARIF, S. Sublingual delivery of vaccines: Can we enhance the immune response induced via this route? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. Supplement 1, p. S39, 1996.

WU, H.; ROSSMAN, M. The canine parvovirus empty capsid structure. **Journal of Molecular Biology**, 223 (2), p. 231-244, 1993.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/70/2011

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **"Resposta imune ao antígeno do CPV 2 encapsulado em nanopartículas de quitosana administrado via sublingual"** (Protocolo CEUA/FCF/328), de responsabilidade da pesquisadora **Fernanda Abdulack Lopes** sob a orientação do Prof. Dr. Marco Antonio Stephano, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi **APROVADO** em reunião de 04 de julho de 2011.

São Paulo, 04 de julho de 2011.

Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

ARTIGO PUBLICADO