



Marque a opção do tipo de trabalho que está inscrevendo:

Resumo

Relato de Caso

Parapoxvirus ovino inativado (iPPOV) como indutor de imunidade em peixes.

AUTOR PRINCIPAL: Lucas De Figueiredo Soveral

CO-AUTORES: Tatiana Rhode Pavan, Cristian Olivo Nled, Rafael Frandoloso, Luiz Carlos Kreutz

ORIENTADOR: Luiz Carlos Kreutz

UNIVERSIDADE: Universidade de Passo-Fundo (UPF)

INTRODUÇÃO

A vacinação de peixes está se tornando uma importante ferramenta para o controle de doenças infecto-contagiosas e é apontada como a principal responsável pela dramática redução no uso de antibióticos na aquicultura (Somerset et al., 2005). As principais vacinas utilizadas contêm micro-organismos inativados, ou parte deles, é requer a adição de adjuvantes para indução de uma resposta imune adequada. Um dos principais desafios da produção de vacinas para peixes está relacionado à produção de antígenos e adjuvantes em larga escala e baixo custo. Em peixes, uma resposta imune eficaz somente é possível por meio da inoculação intraperitoneal ou intramuscular de antígenos emulsionados em adjuvantes oleosos, ou similares (Tafalla et al., 2013), o que representa risco adicional à saúde dos peixes vacinados. Nesse contexto, a utilização de novas moléculas, principalmente aquelas derivadas de micro-organismos, como os padrões moleculares associados aos patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* – PAMPs), representam um avanço significativo na vacinologia.

O Parapoxvirus ovino (PPVO), também conhecido como orf vírus (ORFv), é um vírus envelopado, com material genético DNA, que contém diversos genes que codificam proteínas conhecidas por contra-atacar a resposta imune do hospedeiro (McGuire et al., 2012) e genes homólogos a citocinas do hospedeiro. O efeito imunomodulador do PPVO inativado (iPPVO) em animais terrestres há muito tem sido demonstrado (Fachinger et al., 2000). No entanto, não há estudos sobre a ação desse vírus no sistema imune de peixes. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial adjuvante do iPPVO em peixes imunizados com albumina sérica bovina (BSA) e avaliar possíveis alterações nos parâmetros imunológicos dos peixes imunizados.

DESENVOLVIMENTO:

Foram utilizados jundiás (*Rhamdia quelen*) juvenis com o peso de 50 – 80g, alocados em tanques com 1000 L de água corrente, com densidade máxima de 1g de peixe/L de água. A preparação do iPPVO foi feita conforme descrito anteriormente (Anziliero et al., 2014) e estocado em alíquotas a -20°C contendo 1×10^8 unidades formadoras de placas (UFP)/ml. Todos os peixes foram inoculados pela via intramuscular com uma dose de 100 ul do inóculo. No primeiro experimento, grupos de 15 peixes foram inoculados com iPPVO, ou PBS, e amostras de sangue heparinizado foram coletadas 24h após a inoculação para determinar a explosão respiratória, ou 3, 5 e 7 dias pós-inoculação, para determinar parâmetros hematológicos. No segundo experimento, 5 grupos de peixes (n=15) foram utilizados, os quais receberam os seguintes inóculos: grupo I – PBS estéril; grupo 2 – iPPVO; grupo 3 – BSA (200 µg/peixe); grupo 4 – BSA+iPPVO; grupo V – BSA+adjuvante incompleto de Freund (FIA). Amostras de sangue foram coletadas da veia caudal antes e 35 dias após a inoculação, e mantidas a 4°C até completa coagulação. Após, as amostras foram centrifugadas para remoção do soro o qual foi alíquotado e congelado até a realização dos ensaios. Todos os procedimentos foram realizados em peixes anestesiados (Eugenol, 50 mg/ml). O projeto de pesquisa sobre o uso de adjuvantes em peixes foi aprovado pelo CEUA-UPF (011/2012).

A explosão respiratória das células do sangue total e a análise dos parâmetros hematológicos foram realizadas conforme descrito anteriormente (Kreutz et al, 2011). A quantificação de anticorpos anti-BSA foi feita por meio de um ensaio imunoenzimático indireto do tipo ELISA conforme descrito recentemente (Kreutz et al., 2015). A distribuição normal dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk's. As diferenças entre tratamentos foram analisadas pelo teste t ou ANOVA, seguido do pós teste de comparação múltipla de Bonferroni.

A inoculação de iPPVO não teve efeito na explosão respiratória das células sanguíneas. No entanto, não é possível afirmar que as células de peixe não reconheçam o iPPVO. É provável que as amostras foram coletadas no momento em que as células ainda não estivessem estimuladas (antes ou depois do pico de ativação). Por outro lado, a maioria dos estudos com iPPVO usam monócitos ou neutrófilos isolados e não células totais do sangue. Nesse contexto, é possível que o iPPVO altere a explosão respiratória quando inoculado em populações de células definidas.

Peixes inoculados com iPPVO tiveram uma redução significativa no número de monócitos circulantes aos 3 dias pós-inoculação e um aumento significativo no número de granulócitos heterofílicos e trombócitos aos 5 e 7 dias pós-inoculação, respectivamente. Os demais parâmetros hematológicos permaneceram dentro dos limites para a espécie (Kreutz et al, 2011).

Peixes inoculados com BSA+iPPVO tiveram um aumento significativo nos níveis de anticorpos anti-BSA em comparação ao grupo inoculado somente com BSA, mas inferiores ao grupo inoculado com BSA+FIA. Esses dados indicam o potencial do iPPVO como adjuvante vacinal. O aumento no nível de anticorpos específicos pode estar relacionado interação do iPPVO com células apresentadoras de antígenos, como monócitos (macrófagos e células dendríticas) e a intrincada cadeia de citocinas produzidas a partir da estimulação destas células com um adjuvante do tipo PAMP.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

A inoculação de IPPVO alterou a circulação de diversas células imunológicas e estimulou a produção de anticorpos específicos nos peixes inoculados constituindo-se em um potencial adjuvante para uso em peixes.

REFERÊNCIAS

FACHINGER, V., SCHLAPP, T., STRUBE, W., SCHMEER, N., SAALMÜLLER, A. Poxvirus-induced immunostimulating effects on porcine leukocytes. *J. Virol.* v. 74, p. 7943–51, 2000.

KREUTZ L.C., GIL BARCELLOS L.J., DE FARIA VALLE S., DE OLIVEIRA SILVA T., ANZILIERO D., DAVI DOS SANTOS E., et al. Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. *Fish Shellfish Immunol* v. 30, p.51–7, 2011.

KREUTZ L.C., CANOVA R., NIED C.O., BORTOLUZZI M., FRANDOLOSO R. Isolation of immunoglobulin M from silver catfish (*Rhamdia quelen*) and production of polyclonal antibodies for use in immunoassays. *Fish and Shellfish Immunol.* (submetido), 2015.

MCGUIRE, M.J., JOHNSTON, S. A, SYKES, K.F. Novel immune-modulator identified by a rapid, functional screen of the parapoxvirus ovis (Orf virus) genome. *Proteome Sci.* v. 10, p. 4, 2012.

SOMMERSET, I., KROSSØY, B., BIERING, E., FROST, P. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Rev. Vaccines* v. 4, p. 89–101, 2005.

TAFALLA, C., BØGWALD, J., DALMO, R. A. Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives. *Fish Shellfish Immunol*, v. 1–11, 2013.

NÚMERO DA APROVAÇÃO CEP OU CEUA (para trabalhos de pesquisa): CEUA-UPF (011/2012).