

Efeitos do *Parapoxvirus ovis* inativado (iPPVO) na modulação da resposta imune de moscas *Drosophila* infectadas por *Rhizopus* spp.

Marina Eichenberg Furasté

Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. M. Furasté [ninafuraste@gmail.com – (51) 99806 3450].

ABSTRACT

Parapoxvirus ovis, a species of Poxviridae family virus, is the agent of contagious ecthyma or contagious pustular dermatitis in sheep and goats. The virus has a worldwide distribution and is responsible for significant losses in sheep and goat raising. Nonetheless, this virus, when inactivated, maintains many immunomodulatory properties of the live virus, and can be used to boost the immune system. The fruit-fly *Drosophila melanogaster* has been increasingly used as an effective in vivo experimental model because it is a practical and inexpensive method, with the possibility of working on a large scale in a short period of time. The present work analyzed the effect of *Parapoxvirus ovis* inactivated (iPPVO) on the immune response of *D. melanogaster* infected by *Rhizopus* spp. A total of 300 units of *WT* fly lineage were used for the iPPVO tests and 300 units of the same strain for the control tests, totalizing 600 units of *D. melanogaster* shared into weekly inoculation sections with three samples control and three samples containing 100µl of iPPVO added to the food

one day before the inoculation. Infected and control flies were kept in an incubator at 29 °C for seven days. From the analysis of survival curves using GraphPad Prism, it was not possible to clearly indicate the efficacy of iPPVO due to the great disparity in mortality patterns, as well as the similarity between control and treated groups. Thus, more studies, using different fungal concentrations, are necessary to obtain a reliable conclusion.

RESUMO

Parapoxvirus ovis pertence à família *Poxviridae*, gênero *Parapoxvirus* é o agente do ectima contagioso, ou dermatite pustular contagiosa em ovinos e caprinos, enfermidade exantemática, vesicular e pustular localizada, de distribuição mundial e responsável por importantes perdas na ovinocultura e caprinocultura. Este vírus, quando inativado, mantém muitas propriedades imunomoduladoras do vírus vivo, com ações sobre a resposta imune inata, das quais já foram investigadas utilizando células imunes de várias espécies animais e configurações experimentais. A mosca das frutas, *Drosophila melanogaster*, vem sendo cada vez mais utilizada como um eficaz modelo de experimentação in vivo, devido a sua praticidade, ao seu custo acessível, e possibilidade de se trabalhar em grande escala, em um curto período de tempo. O presente trabalho analisou os efeitos do *Parapoxvirus ovis* inativado (iPPVO) na resposta imune de moscas *D. melanogaster* após infecção por *Rhizopus* spp. Foram utilizadas 300 unidades de moscas fêmeas da linhagem WT para os testes com o iPPVO e 300 unidades da mesma linhagem para os testes controle, totalizando 600 unidades de *D. melanogaster*, divididas em sessões semanais de inoculação, com três frascos controle e três frascos contendo 100 µL de iPPVO adicionado à comida um dia antes da inoculação. Os frascos com as moscas inoculadas e com as moscas controle foram mantidos em estufa à temperatura de 29 °C por sete dias. A partir da análise de curvas

de sobrevivência utilizando o GraphPad Prism, não foi possível indicar com clareza a eficácia do uso do iPPVO devido à grande desuniformidade nos padrões de mortalidade, bem como à semelhança nos dados entre os grupos controle e grupos tratados. Dessa forma, mais estudos, utilizando diferentes concentrações fúngicas, são necessários para obter uma conclusão fidedigna.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**Efeitos do *Parapoxvirus ovis* inativado (iPPVO) na modulação da resposta imune
de moscas *Drosophila* infectadas por *Rhizopus* spp**

Autor: Marina Eichenberg Furasté

**Trabalho apresentado à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para
a obtenção da graduação em Medicina
Veterinária**

Orientador: Prof. Régis Adriel Zanette

PORTO ALEGRE

2017/1

INTRODUÇÃO

Parapoxvirus ovis, pertencente à família *Poxviridae*, gênero *Parapoxvirus* é conhecido por ser o agente do ectima contagioso, ou dermatite pustular contagiosa em ovinos e caprinos, enfermidade exantematosa, vesicular e pustular localizada, de distribuição mundial e responsável por importantes perdas na ovinocultura e caprinocultura. O vírus geralmente penetra pela pele ou nas junções mucocutâneas dos lábios e do focinho, pelo contato direto entre animais ou pelo contato e lesões causadas por pastagens abrasivas. Animais de todas as idades podem ser acometidos, no entanto, o quadro clínico é mais severo em cordeiros lactentes que geralmente perdem peso e podem morrer de inanição por não se alimentarem devido às lesões na boca e comissuras labiais. Condições deficientes de higiene, deficiência de vitamina A, estresse e outras condições que causem imunodepressão, predispõem à ocorrência de surtos severos (FLORES, 2012). Em vários países, a vacinação tem sido utilizada com relativo sucesso a fim de reduzir as perdas associadas à doença (ANZILIERO et. al, 2011). Apesar de uma intensa resposta inflamatória primária durante a infecção natural, *P. ovis* apresenta a capacidade de reinfetar o hospedeiro em um curto período de tempo, o que provavelmente esteja relacionado aos mecanismos de evasão da imunidade e ao tipo de resposta imunológica do hospedeiro (HAIG, 2006). A resposta imunológica à infecção por *P. ovis* é caracterizada por uma resposta imune inata de caráter intensamente inflamatório, seguido pelo desenvolvimento da imunidade adquirida, aparentemente, de curta duração (HAIG, 2006). *Poxvirus* são conhecidos por modular vários aspectos da resposta imunológica do hospedeiro. Eles codificam diversos fatores imunorregulatórios que agem em diferentes vias de sinalização celular. Os efeitos imunomoduladores de *P. ovis* já são há muito tempo reconhecidos e suscitaram um interesse significativo na pesquisa veterinária nas últimas décadas. O *P. ovis* inativado (iPPVO) mantém muitas propriedades imunomoduladoras do vírus vivo, sugerindo que esses efeitos devem

depende dos componentes estruturais da partícula viral. Os efeitos do iPPVO sobre a resposta imune inata foram investigados *in vitro* em células imunes de várias espécies e configurações experimentais (ANZILIERO et al, 2014). A administração do iPPVO foi demonstrada primeiramente em camundongos desafiados com *Pseudomonas aeruginosa*, para reduzir a mortalidade. Então, vários estudos investigaram os efeitos imunoestimuladores do iPPVO em diferentes condições patológicas.

Os efeitos promissores do iPPVO como imunoestimulantes levaram ao desenvolvimento de um produto comercial chamado Baypamun®, cujos efeitos foram posteriormente demonstrados em doenças infecciosas e distúrbios mediados pelo estresse de várias espécies animais (ANZILIERO et al, 2014). Baypamun® é um modulador imunológico, produzido a partir de *P. ovis*, que estimula a resposta imune inespecífica e é recomendado para a prevenção e tratamento de doenças infecciosas. Este produto, estudado em várias espécies de animais, melhorou a concentração de anticorpos no leite de porcas primíparas e aumentou a sobrevivência de leitões. Na mesma espécie, o tratamento de doenças produtivas e síndromes respiratórias com Baypamun® reduziu a mortalidade e aumentou o peso corporal.

Tradicionalmente, espécies de animais mamíferos vinham sendo consideradas padrão ouro como modelos experimentais em estudos e ensaios laboratoriais, tanto na medicina humana, quanto na medicina veterinária. Entretanto, restrições logísticas, éticas e econômicas representam verdadeiras barreiras na continuidade destes estudos. Devido a estas limitações, diversos estudos foram relatados recentemente em diferentes hospedeiros não vertebrados, entre eles a mosca-das-frutas (*Drosophila melanogaster*). Uma vez que as moscas podem ser cultivadas, manipuladas e analisadas em grande número e de forma menos trabalhosa e com menor custo do que os modelos animais convencionais, *D. melanogaster* vem sendo usada como um eficaz modelo de sistema *in vivo*. Estes crescentes estudos levaram a uma maior compreensão dos mecanismos de

reconhecimento de patógenos, da base molecular da sinalização imune e uma descrição das respostas específicas de insetos a infecções microbianas. A resposta imune da mosca-da-fruta frente a patógenos, como bactérias e fungos, ocorre através de dois caminhos complementares: *Toll* e *Imd*, que regulam diferentes membros da família de fatores de transcrição e expressão de genes que codificam peptídeos antimicrobianos. Dessa forma, o sistema imunológico de *Drosophila* demonstra como duas vias de sinalização distintas podem modular a expressão de genes em resposta a diferentes classes de micróbios, servindo assim como um modelo simples para decifrar mecanismos imunes inatos.

O presente trabalho visa estudar os efeitos do iPPVO na resposta imune de moscas da espécie *D. melanogaster* após infecção *in vitro* por fungos do gênero *Rhizopus* spp.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas moscas Oregon *R* (*wild-type*), obtidas da University of Texas MD Anderson Cancer Center, mantidas no Laboratório de Experimentação em Drosófila, pertencente ao Departamento de Farmacologia, situado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS-UFRGS). O isolado fúngico do gênero *Rhizopus* spp. utilizado para a infecção das moscas, foi obtido na micoteca do Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia (ICBS-UFRGS). O iPPVO foi obtido do Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria. O alimento padrão para as moscas consiste de 1% de ágar bacteriológico, 2% de açúcar, 1% de leite em pó, 1% de fermento biológico seco e 0,09% de conservante Nipagin, adicionados à água destilada. A infecção e a efetividade do tratamento foram avaliadas através de curvas de sobrevivência (teste Logrank, software GraphPad) e através da contagem diária de mortes no período de sete dias após a infecção.

Separação e Preparo dos Tubos: cada sessão de inoculação das moscas continha um total de seis frascos analisados por semana, sendo três frascos contendo 100 µL iPPVO previamente adicionado (1 dia antes) à comida das moscas e três frascos controle, sem a adição do vírus inativado. Em cada frasco adicionamos 10 moscas fêmeas da linhagem WT e deixamos em estufa à temperatura de 29 °C por um dia, para que houvesse tempo da absorção do iPPVO no alimento. No dia seguinte à separação das moscas, foi realizada a infecção por *Rhizopus* spp.

Inóculo: o preparo do fungo consiste em adicionar aproximadamente 2,5 ml de PBS (tampão salina fosfato) ao tubo de ensaio contendo o cultivo fúngico, misturando bem para soltar do meio de cultura. Após, a mistura é passada por um sistema de filtragem. A mistura contendo o inóculo é então medida em Câmara de Neubauer para contagem e verificação da concentração. Com o inóculo pronto, é realizada a infecção, com uma agulha tamanho 000 estéril, que foi mergulhada em tubo Eppendorf contendo o inóculo fúngico (10^7 esporos/mL) e então inoculada na porção lateral tórax das moscas anestesiadas através do uso de gás carbônico (CO₂). Os frascos inoculados foram incubados em estufa à temperatura de 29 °C por um período de sete dias, onde foi feita a contagem da mortalidade em cada tubo, todos os dias do período.

Em cada grupo amostrado, mantivemos um frasco não inoculado, ou seja, nos três frascos contendo iPPVO e nos três frascos controle, um frasco em cada grupo não sofreu inoculação fúngica, como uma segunda forma de controle.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante os testes realizados, foram utilizadas 300 unidades de moscas fêmeas da linhagem WT para os testes com o iPPVO e 300 unidades da mesma linhagem para os testes controle, totalizando um total de 600 unidades de *D. melanogaster* no presente

estudo. Destas, obtivemos um descarte de sete unidades nos testes com iPPVO e 31 unidades nos testes controle, descartadas tanto por falha no inóculo, contaminação, ou mortalidade pela manipulação. A mortalidade das moscas foi contabilizada por sete dias após a inoculação das mesmas. No início do estudo, utilizamos um padrão de concentração do inóculo fúngico na base exponencial de 10^7 , com valores de 2×10^7 , $3,9 \times 10^7$ e $1,5 \times 10^7$ nas três primeiras sessões de teste respectivamente. A primeira semana de testes foi desconsiderada, as mortes contabilizadas na segunda e na terceira inoculações podem ser observadas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1: número diário de mortes das moscas inoculadas na segunda seção. Inóculo = $3,9 \times 10^7$

Amostra	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7
ppvo ÑI n = 10	-	4	-	-	-	-	-
ppvo n = 10	-	8	2	-	-	-	-
ppvo n = 10	1	6	-	1	1	-	1
ppvo n = 10	1	9	-	-	-	-	-
ppvo n = 10	-	9	-	-	-	-	-
ppvo n = 05	-	3	-	-	-	-	-
controle ÑI n = 10	1	-	-	-	-	1	-
controle n = 10	2	6	-	-	1	-	-
controle n = 07	2	5	-	-	-	-	-
TOTAL	7	50	2	1	2	1	1

Tabela 2: número diário de mortes das moscas inoculadas na terceira seção. Inóculo = $1,5 \times 10^7$

Amostra	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7
ppvo ÑI n = 10	2	-	-	-	-	1	-
ppvo n = 10	1	9	-	-	-	-	-
ppvo n = 09	3	6	-	-	-	-	-
controle ÑI n = 10	-	-	-	1	-	-	1
controle n = 10	4	6	-	-	-	-	-
controle n = 09	2	7	-	-	-	-	-
TOTAL	12	28	-	1	-	1	1

O número de mortes nestas duas seções foi mais expressivo nos dois primeiros dias pós inoculação, principalmente no segundo dia, mantendo-se basicamente estável no restante da semana. A mortalidade, tanto nas amostras tratadas com iPPVO, quanto nas amostras controle, foi muito superior ao esperado, possivelmente em razão da concentração do inóculo preparado. Para as sessões seguintes, utilizamos uma concentração fúngica de valor inferior, visando equilibrar a mortalidade demasiada. Nas sessões seguintes (Tabelas 3 a 8), podem ser

observadas as contagens de mortalidade diária com expressiva queda, após utilizarmos inóculo fúngico com concentração 100x mais baixa (10^5) que nas sessões iniciais.

Tabela 3: número diário de mortes das moscas inoculadas na quarta seção. Inóculo = $1,6 \times 10^5$

Amostra	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7
ppvo ÑI n = 10	-	-	-	-	-	2	-
ppvo n = 10	3	1	-	-	-	-	-
ppvo n = 09	-	4	2	-	-	-	-
controle ÑI n = 10	-	-	-	-	-	-	-
controle n = 10	-	-	1	-	2	1	-
controle n = 08	-	-	-	1	2	1	-
TOTAL	3	5	3	1	4	4	-

Tabela 4: número diário de mortes das moscas inoculadas na quinta seção. Inóculo = $6,5 \times 10^5$

Amostra	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7
ppvo ÑI n = 10	-	-	-	-	-	-	-
ppvo n = 10	5	-	1	-	-	-	-
ppvo n = 09	2	2	1	1	-	1	1
controle ÑI n = 10	-	-	-	-	-	-	-
controle n = 09	2	2	-	1	1	-	1
controle n = 09	3	2	-	-	2	-	-
TOTAL	12	6	2	2	3	1	2

Tabela 5: número diário de mortes das moscas inoculadas na sexta seção. Inóculo = $4,9 \times 10^5$

Amostra	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7
ppvo ÑI n = 10	-	-	-	-	-	1	-
ppvo n = 10	-	1	-	-	-	-	-
ppvo n = 09	1	-	1	-	-	-	-
controle ÑI n = 10	-	2	-	1	1	-	-
controle n = 10	-	-	1	-	-	-	-
controle n = 09	1	1	1	-	1	-	-
TOTAL	2	4	3	1	2	-	-

Tabela 6: número diário de mortes das moscas inoculadas na sétima seção. Inóculo = 4×10^5

Amostra	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7
ppvo ÑI n = 09	-	-	-	-	-	-	-
ppvo n = 10	-	-	-	1	-	-	-
ppvo n = 10	-	-	-	-	-	-	1
controle ÑI n = 10	-	-	2	-	-	-	1
controle n = 09	1	-	-	1	-	2	-
controle n = 10	-	1	-	-	-	-	-
TOTAL	1	1	2	2	-	2	2

Tabela 7: número diário de mortes das moscas inoculadas na oitava seção. Inóculo = $7,5 \times 10^5$

Amostra	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7
ppvo ÑI n = 10	1	-	-	2	-	-	-
ppvo n = 10	-	-	-	-	1	1	-
ppvo n = 10	-	-	-	2	-	-	-
ppvo n = 09	-	1	1	-	-	1	1
ppvo n = 10	-	1	-	-	-	-	-
ppvo n = 10	-	-	1	-	-	-	-
controle ÑI n = 10	2	-	-	1	-	-	1
controle n = 10	-	-	2	1	-	-	-
controle n = 10	-	-	-	-	-	-	-
controle n = 10	-	-	-	-	-	-	-
controle n = 10	-	3	1	-	-	-	-
controle n = 10	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	3	5	5	6	1	2	2

Tabela 8: número diário de mortes das moscas inoculadas na nona seção. Inóculo = 8×10^5

Amostra	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7
ppvo ÑI n = 10	1	-	-	-	-	-	-
ppvo n = 09	-	-	-	1	-	-	-
ppvo n = 10	-	-	-	-	-	-	-
controle ÑI n = 10	-	-	-	-	-	-	-
controle n = 10	-	-	-	2	-	-	-
controle n = 10	1	-	-	-	-	-	-
TOTAL	2	-	-	3	-	-	-

A partir da elaboração das tabelas de contagem de mortes, formulamos, através do programa “GraphPad Prism”, as curvas de sobrevivência para cada sessão realizada, onde é possível observar o percentual de sobrevivência das moscas em função do tempo (7 dias), ou seja, estes gráficos indicam a quantidade de moscas que sobreviveram à infecção fúngica ao longo do período estudado. Assim, podemos estabelecer uma comparação entre os grupos controle e grupos tratados com o vírus inativado para, posteriormente, definir o quão eficaz ele foi na estimulação da resposta imune.

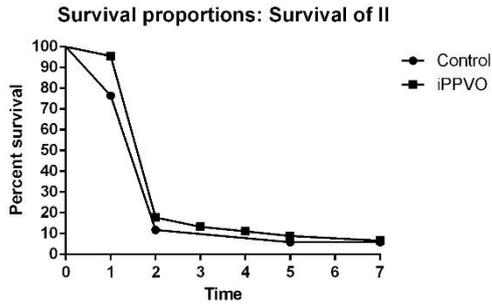


Figura 1 - taxa de sobrevivência na sessão 2

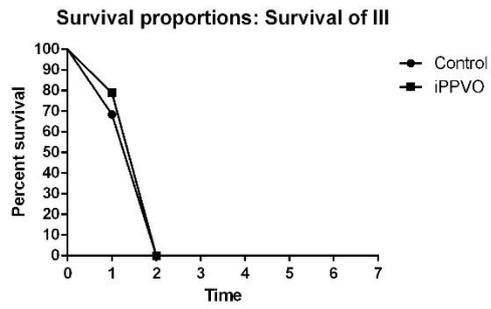


Figura 2 - taxa de sobrevivência na sessão 3

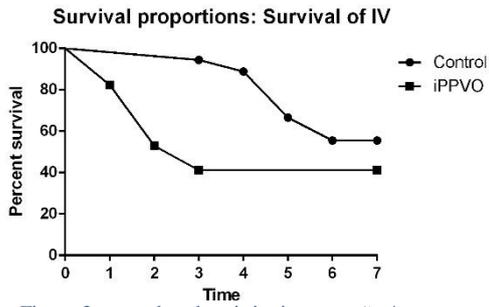


Figura 3 - taxa de sobrevivência na sessão 4

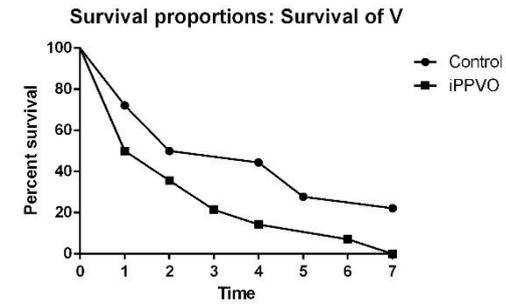


Figura 4 - taxa de sobrevivência na sessão 5

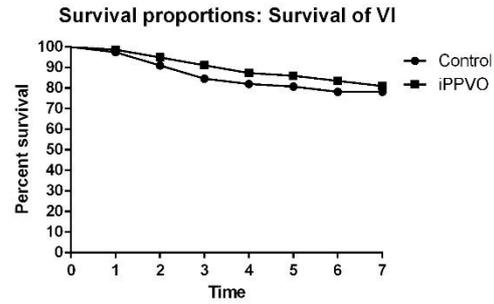


Figura 5 - taxa de sobrevivência na sessão 6

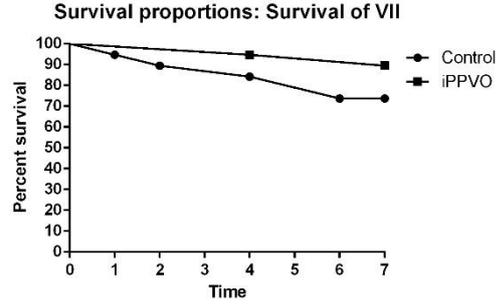


Figura 6 - taxa de sobrevivência na sessão 7

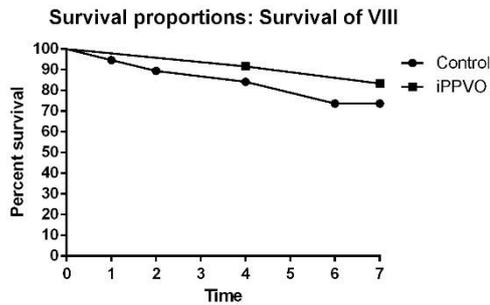


Figura 7 - taxa de sobrevivência na seção 8

Ao analisarmos estes gráficos, foi possível notar uma heterogeneidade nos padrões de sobrevivência, com ausência de um padrão estável na mortalidade das moscas, em ambos os grupos (controle e iPPVO). Por outro lado, percebe-se notável diferença na contagem de sobrevivência após a redução na concentração do inóculo fúngico. A mortalidade nos grupos controles em todas as seções se manteve semelhante à mortalidade nos grupos tratados com iPPVO, impedindo uma análise mais fidedigna da ação do vírus inativado frente a infecção fúngica. Da mesma forma, não foi possível estabelecer uma diferença notável entre os frascos que passaram pelo inóculo fúngico e os frascos não inoculados.

CONCLUSÕES

Após estabelecer a contabilização das mortes diárias e da elaboração das curvas de sobrevivência, não foi possível indicar com clareza a eficácia do uso do iPPVO devido à grande desuniformidade nos padrões de mortalidade, bem como à semelhança nos dados entre os grupos controle e grupos tratados. Analisando a expressiva queda nas mortes após as sessões 2 e 3, juntamente com o padrão semelhante entre os grupos estudados, pode-se dizer que grande parte se deve à redução da concentração do inóculo fúngico utilizado. O desenvolvimento deste trabalho possibilitou uma análise geral de como *D. melanogaster* atua eficientemente com um modelo prático de estudo, permitindo a utilização de grandes quantidades em um curto espaço de tempo. Todavia, em relação à eficiência do iPPVO como imunomodulador neste modelo, ainda necessitamos de uma continuidade no trabalho, a fim de se obter dados mais consistentes e precisos, além de adequarmos a concentração fúngica do inóculo para que a taxa de sobrevivência se estabeleça de maneira mais concisa e harmoniosa entre os grupos de estudo.

REFERÊNCIAS

FLORES, E.F. **Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas**. 2.ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2012. p. 595-597.

ANZILIERO, D.; KREUTZ, L.C.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R. Effects of inactivated *Parapoxvirus ovis* on cellular and humoral events of the innate immune response in mice. **Cellular Immunology**, v. 289, p. 36-41, may–jun. 2014.

ANZILIERO, D.; WEIBLEN R.; KREUTZ, L.C.; SPILK, F.I; FLORES, E.F. Inactivated *Parapoxvirus ovis* induces a transient increase in the expression of proinflammatory, Th1-related, and autoregulatory cytokines in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47(2), p. 110-118, fev.2014.

HAIG, D. M. Orf virus infection and host immunity. **Current Opinion in Infectious Disease**, United States, v. 19, p. 127-31, apr.2006.

LANGONI, H.; SEABRA JÚNIOR, R.; CABRAL, K.G.; CUNHA, E.L.P. Baypamun® action in hamsters experimentally infected with *Leptospira interrogans* serogroup Canicola - **Brazilian Journal of Veterinay Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n.6, p. 293-295, 2001.

ROLFF, J.; REYNOLDS, S.E. *Drosophila* as a model for studying antiviral defences. In: **Insect Infection and Immunity - Evolution, Ecology and Mechanisms**. Oxford University Press, 2009. P. 49-68.