

ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE CELULAR DE UMA VARIANTE DA BRONQUITE INFECCIOSA AVIÁRIA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Ricardo Forner¹, Lara Trevisol², Cintia Okino³, Liana Brentano² e Ana Paula Almeida Bastos²

¹Graduando em Medicina Veterinária pelo Instituto Federal Catarinense, Campus Concórdia, estagiário da Embrapa Suínos e Aves, Bolsista CNPQ/PIBIC.

²Pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves.

³Analista da Embrapa Pecuária Sudeste.

Palavras-chave: linfócito, ave, imunologia, macrófago, vacina

INTRODUÇÃO

O vírus da bronquite infecciosa (IBV) é um coronavírus aviário que causa uma doença altamente infecciosa caracterizada por sinais respiratórios, reprodutivos e renais, dependendo do tropismo viral e resulta em um impacto econômico significativo para a indústria de aves em todo o mundo (1). O IBV possui altas taxas de recombinação e mutação, podendo levar a formação de vírus identificados como variantes, cujas diferenças podem não serem reconhecidas pelos anticorpos induzidos pela cepa vacinal (2). O IBV replica principalmente nas células epiteliais do trato respiratório superior das galinhas, induzindo alterações morfológicas e imunológicas. No entanto, a associação entre a resposta imune local induzida pelo IBV e os mecanismos de evasão imune viral ainda não foram completamente elucidados.

O controle da bronquite infecciosa aviária se faz através da imunização das aves, bem como através de uma segura avaliação das propriedades antigênicas dos vírus circulantes (3,4). Mesmo assim, falhas de proteção da vacina no campo podem estar relacionadas com proteção cruzada incompleta entre a estirpe de vacina e as cepas variantes. O presente trabalho teve como objetivo avaliar, por citometria de fluxo, marcadores relacionados a resposta imune celular, no sangue periférico de aves desafiadas com uma amostra variante de IBV.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados quatro grupos de 30 pintainhos SPF (*Specific Pathogen Free*) cada um, da linhagem *White Leghorn*. As aves foram alojadas em isoladores de pressão positiva. Os grupos foram classificados em grupo controle não desafiado (CN), grupo desafiado com estirpe respiratória não patogênica (NP), grupo desafiado com estirpe suspeita de ser nefropatogênica (NF) e grupo desafiado com estirpe respiratória patogênica (RP), sendo que todos os grupos receberam dose completa (104,3DIE50, tal como recomendado pelo fabricante) de vacina atenuada estirpe H120 de IBV no primeiro dia de idade, por via ocular-nasal. Aos 28 dias de idade, os grupos NP, NF e RP foram infectados experimentalmente por via intra-ocular e intranasal, tais como: NP) amostra vacinal de referência – estirpe respiratória não patogênica (genotipicamente semelhante à M41, porém atenuada); NF) amostra de campo – suspeita de ser nefropatogênica (IBV-Variante 448/1998); e RP) amostra respiratória patogênica de referência para BI – M41 um isolado de campo Brasileiro de IBV (estirpe F3735). O grupo CN, controle negativo, foi simulado infectado com líquido alantóico SPF e mantido sob as mesmas condições dos outros grupos. As estirpes M41 e a vacinal foram titulados em ovos de galinha embrionados de acordo com procedimentos padrão (5), e a dose infecciosa de 50% do embrião (EID50) foi de $10^{3,50}$ a $10^{4,0}$.

As amostras de sangue foram coletadas um dia pós-infecção (pi) e processadas no mesmo dia para análise por citometria. As células mononucleares (CMN) do sangue foram isoladas através do gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (Amershan Biosciences). Em seguida, as amostras foram incubadas com os seguintes anticorpos: camundongo anti-galinha CD45 (clone LT40, IgG1, conjugado APC); camundongo anti-galinha CD4 (clone CT-4, IgG1, conjugado a FITC); camundongo anti-galinha CD8 α (clone CT-8, IgG1, conjugado a R-PE); camundongo anti-galinha MHC classe II (clone 2G11, IgG1, conjugado a FITC); camundongo anti-galinha TCR $\alpha\beta$ /V β 1 (clone TCR-2, IgG1, conjugado a RPE); camundongo anti-galinha CD28 (clone AV7, IgG1, conjugado a FITC); e camundongo anti-galinha Kul-01 (clone KUL01, IgG1, conjugado a R-PE). A citometria de fluxo foi realizada em um citômetro de fluxo Accuri® (Becton Dickinson) e as fluorescências dos anticorpos foram detectadas nos canais FL1 (nm 530/30) para FITC, FL2 (nm 585/42) para PE, e FL3 (nm 661/16) para APC. Foram analisados 50.000 eventos da seleção (*gate*) de linfócitos (com base na dispersão frontal e lateral -FSC e SSC). Os dados foram analisados com o *software* Accuri C6 plus (Becton Dickinson). Foi realizada análise e verificação de normalidade dos dados pelo teste de Kolmogorov e Smirnov. Os resultados dos diferentes grupos foram comparados entre si por ANOVA one-way, seguido de um Post Hoc de Tukey, com nível de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A população de leucócitos circulantes não apresentou diferenças em nenhum grupo desafiado com relação ao grupo controle no tempo analisado (1 pi). A quantidade de monócitos fagocíticos no grupo controle ($38,7 \pm 19,1$) apresentou maior quantidade de células circulantes que nos grupos desafiados (NP: $23,5 \pm 9,7$, $p < 0,05$; NF: $16,7 \pm 7,6$, $p < 0,01$; e RP: $7,9 \pm 6,9$, $p < 0,001$, Tabela 1). O grupo NP apresentou uma quantidade de monócitos fagocíticos significativamente maior que o grupo RP ($p < 0,05$). Entretanto, à

1 pi o grupo desafiado NP apresentou uma tendência de maior quantidade de células apresentadoras de antígenos não monocíticas (APC) comparada ao grupo controle, mas os grupos NF e RP apresentaram maior quantidade de APC ($p < 0,001$) do que o grupo controle. No tempo pré-determinado observamos uma quantidade significativamente maior de linfócitos T não ativados circulantes nos grupos desafiados que no grupo controle. De fato, para T CD4 não ativado observamos uma quantidade menor nos grupos desafiados NP ($p < 0,05$), NF ($p < 0,001$) e RP ($p < 0,001$); já para T CD8 não ativado observamos uma quantidade reduzida nos grupos desafiados NP ($p < 0,001$), NF ($p < 0,001$) e RP ($p < 0,001$) quando comparados com o grupo controle (CN). No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos na quantidade de células TCD4 ativadas e TC8 ativadas circulantes.

A resposta precoce, já ao 1 pi, chama a atenção, em todas os desafios, pelo aumento da circulação de linfócitos T CD4 não ativados - devido ao pouco tempo de desafio, provavelmente trata-se de linfócitos T CD4 virgens. O aumento destas células na circulação sugere que, muito precocemente, o animal desafiado apresentou uma maior capacidade de resposta inata mediada por APC e também de elementos participantes da resposta adaptativa como linfócitos T CD4 ($CD4^+ TCRV\beta 1^+$). Conforme esperado, os grupos desafiados apresentaram menores quantidades circulantes de linfócitos T CD8 não ativados, bem como monócitos. Por se tratar de uma fase aguda do desafio viral a redução do número absoluto de linfócitos deva-se principalmente ao fenômeno denominado *homing* em que há a saída dos linfócitos virgens (*naïve*) (caracterizados pelo fenótipo $CD8\alpha^+ CD28^+$) da circulação, e a sua entrada nos tecidos linfóides, onde serão ativados. Também há redução absoluta de linfócitos T citotóxicos efetores (marcados pelo fenótipo $CD8\alpha^+ CD28^-$), mas em proporção menor.

CONCLUSÕES

A complementariedade de respostas, ou seja, diferentes tipos celulares respondendo aos desafios com estirpes distintas foi observada neste estudo. Indicando que o desafio com distintas estirpes apresentaram padrões de resposta imune inata e adaptativa semelhantes em um dia pós-infecção, demonstrando que o sistema imunológico, como um todo, acaba sendo afetado visto que as células de defesa se comunicam e se influenciam mutuamente.

REFERÊNCIAS

1. Cavanagh, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Vet. Res.** 38, 281-297. 2007.
2. Cavanagh, D.; Davis, J. P.; Mockett, A. P. A. Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. **Virus Research**, 11:141-150. 1988.
3. Cubillos, A.; Ulloa, J.; Cubillos, V.; Cook, J. K. A. Characterization of bronchitis virus isolated in Chile. **Avian pathology**. V20, p.85-99. 1991.
4. Mendonça, J. F. P.; Martins, N. R. S.; Carvalho, L. B.; de Sá, M. E. P.; de Melo, C. B. Bronquite infecciosa das galinhas: conhecimentos atuais, cepas e vacinas no Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.8, p.2559-2566, nov. 2009.
5. Owen R, Cowen BS, Hattel A, Naqi SA, Wilson RA. Detection of viral antigen following exposure of one-day-old chickens to the Holland-52 strain of IBV. **Avian Pathol** 1991;20(4):663-673.

Tabela 1. Resultados da avaliação imunológica por citometria de fluxo das aves infectadas pelo IBV. Dados mostrados como média \pm SD.

GRUPO	CD45 ⁺	Kul1 ⁺ MHCII ⁺	Kul1 ⁻ MHCII ⁺	CD4 ⁺ TCRV β 1 ⁺	CD4 ⁺ TCRV β 1 ⁻	CD8 α ⁺ CD28 ⁺	CD8 α ⁺ CD28 ⁻
CN	80,3 \pm 6,4	38,7 \pm 19,1	58,5 \pm 19,7	38,3 \pm 19,5	24,7 \pm 14,5	63,9 \pm 18,7	11,4 \pm 5,9
NP	73,9 \pm 13,0	23,5 \pm 9,7 ^a	73,7 \pm 11,2	25,6 \pm 15,7	43,3 \pm 18,4 ^a	31,6 \pm 15,7 ^c	25,1 \pm 14,8
NF	70,1 \pm 18,3	16,7 \pm 7,6 ^b	82,9 \pm 7,7 ^c	34,4 \pm 12,8	56,6 \pm 12,3 ^c	25,4 \pm 7,7 ^c	17,7 \pm 8,3
RP	73,6 \pm 1,3	7,8 \pm 6,9 ^{c,d}	89,0 \pm 6,1 ^c	24,6 \pm 12,5	67,8 \pm 14,2 ^{c,d}	15,6 \pm 6,5 ^c	15,8 \pm 8,4

^aP < 0,05 versus CN

^bP < 0,01 versus CN

^cP < 0,001 versus CN

^dP < 0,05 versus NP