

ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE CELULAR INDUZIDAS POR DESAFIO COM AMOSTRAS CLASSICAS E VARIANTE DE VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA AVIÁRIA

I.M. Trevisol¹, G. Mattos (in memoriam)¹, C. Okino², L. Brentano¹, A. Coldebella¹, L. Baron¹, A.P. Bastos¹

¹Embrapa Suínos e Aves – Laboratório de Sanidade e Genética Animal – Concórdia – SC- Brasil

²Embrapa Pecuária Sudeste – São Carlos – SP- Brasil

Introdução

A bronquite infecciosa das galinhas (BI) é causada por um vírus que, possui altas taxas de recombinação e mutação (VBI), podendo levar a formação de vírus identificados como variantes (1). A replicação primária do VBI ocorre 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 VBI e os mecanismos de evasão imune viral ainda não foram completamente elucidados (2). O presente trabalho, teve como objetivo avaliar por citometria de fluxo, marcadores relacionados a resposta imune celular, no sangue periférico de aves infectadas experimentalmente com amostras de VBI clássicas e com um isolado de campo brasileiro genotipado como variantes.

Material e Métodos

Utilizou-se 40 aves SPF (Embrapa Suínos e Aves) com um dia de idade alojadas em isoladores de pressão positiva. Foram formados 4 grupos:

CN- controle não desafiado recebeu o mesmo diluente das amostras (meio de cultura F1-199);

NP- estirpe respiratória clássica, atenuada: vacina comercial H120/BRMSA1775;

NF- estirpe patogênica respiratória e suspeita de ser nefrogênica (IBV-variante 448/BRMSA1779).

RP- estirpe respiratória clássica, altamente patogênica: amostra padrão: M41/BRMSA1765.

As estirpes armazenadas no BRMSA (Banco de microorganismos Embrapa suínos e Aves) foram tituladas em ovos de galinha embrionados de acordo com procedimentos padrão (3). A dose infecciosa de 50% em embrião de $10^{3,50}$ a $10^{4,0}$ DIE_{50} foi utilizada para infecção experimental por via intra-ocular e intranasal aos 28 dias de idade nos grupos NP, NF e RP. Nos intervalos de 1 e 5 dias pós-infecção (dpi), coletou-se sangue e isolamos as células mononucleares através do gradiente de densidade Ficoll-Hypaque. Depois, as amostras foram incubadas com os anticorpos: CD45-APC; CD4-FITC; CD8 α -PE; MHC classe II-FITC; TCR $\alpha\beta$ /V β 1-PE; CD28-FITC; Kul-01-PE; Bu-1-FITC. Os resultados dos diferentes grupos foram comparados entre si por ANOVA two-way, seguido de um Post Hoc de Tukey, com nível de significância de $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Análises com 1 dpi: a quantidade de monócitos fagocíticos no grupo controle (CN) apresentou maior quantidade de células circulantes que nos grupos desafiados (NP: $p < 0,05$; NF: $p < 0,01$; e RP: $p < 0,001$). Os grupos desafiados (NP, NF e RP) apresentaram uma quantidade significativamente maior de células apresentadoras de antígenos não monocíticas (APC) ($p < 0,001$) do que o CN, sendo que os grupos desafiados com as estirpes patogênicas (RP e NF) apresentaram também maior recrutamento dessas células que a de baixa patogenicidade (NP). Ao contrário, nas análises de monócitos circulantes observamos que os grupos desafiados com as estirpes de maior patogenicidade mostraram uma quantidade significativamente menor que o grupo CN ($p < 0,0001$). Como esperado, houve uma maior quantidade de

linfócitos T não ativados circulantes nos grupos desafiados, quando comparados ao grupo CN; já para T CD8 não ativado observamos uma redução nos grupos desafiados NP ($p < 0,001$), NF ($p < 0,001$) e RP ($p < 0,001$) quando comparados com o grupo CN. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos na quantidade de células TCD4 e TC8 ativadas circulantes, bem como para linfócitos B.

Análises com 5 dpi: quando comparamos as análises das populações celulares de 1dpi com o 5dpi observamos que os grupos desafiados apresentaram um aumento significativo na quantidade de monócitos circulantes ($p < 0,05$); enquanto, a população de APC não monocíticas e linfócitos TCD4 não ativados apresentaram uma redução. Como esperado, os linfócitos TCD4 e CD8 ativados apresentaram um aumento significativo nos grupos desafiados, resultado não observado no CN; os grupos desafiados ainda apresentaram TCD4+ (NP: $p < 0,05$; NF: $p < 0,05$; RP: $p < 0,05$) e TCD8+ (NP: $p < 0,05$; NF: $p < 0,05$; RP: $p < 0,05$) significativamente maior que o CN no 5dpi. Por fim, a população de linfócitos B nos grupos desafiados aumentou no 5dpi e apresentaram-se significativamente maior que o grupo CN.

A resposta precoce, já ao 1º dpi, chama a atenção, em todos os desafios, pelo aumento da circulação de linfócitos TCD4 não ativados. O aumento destas células na circulação sugere que, muito precocemente, as aves desafiadas apresentaram uma maior capacidade de resposta inata mediada por APC e também de elementos participantes da resposta adaptativa como linfócitos TCD4 (CD4⁺ TCRV β 1). Conforme esperado, os grupos desafiados apresentaram menores quantidades circulantes de linfócitos TCD8 não ativados, bem como monócitos. Por se tratar de uma fase aguda do desafio viral, a redução do número absoluto de linfócitos deve-se principalmente ao fenômeno denominado *homing* em que há a saída dos linfócitos virgens (*naïve*) (caracterizados pelo fenótipo CD8 α *CD28⁺) da circulação, e a sua entrada nos tecidos linfóides, onde serão ativados. Após 5dpi observamos um padrão de resposta imune adaptativa semelhante nas aves desafiadas; um aumento de anticorpos circulantes e de células efetoras contra um desafio viral.

Conclusão

A complementariedade de respostas, ou seja, diferentes tipos celulares respondendo aos desafios com estirpes distintas apresentaram padrões de resposta imune inata e adaptativa maiores nos grupos desafiados com variantes patogênicas, mas semelhantes entre si.

Bibliografia

1. Cavanagh, D. Veterinary Research 2007; 38: 281-297.
2. Mendonça, J. F. P.; Martins, N. R. S.; Carvalho, L. B.; de Sá, M. E. P.; de Melo, C. B. Ciência Rural, 2009; 39:2559-2566.
3. Owen R, Cowen BS, Hattel A, Naqi SA, Wilson RA. Avian Pathology 1991; 20(4):663-673.