

COMPARAÇÃO POR DIFERENTES MÉTODOS DA RESPOSTA IMUNE PRECOCE INDUZIDA PELA INFECÇÃO COM DIFERENTES VARIANTES DE CAMPO BRASILEIRAS DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA EM AVES

Lana F. Baron¹, Iara Trevisol², Francisco N. Da Fonseca³, Liana Brentano², Franciana A. Volpato Bellaver⁴ e Ana P. A. Bastos²

¹Graduanda em Farmácia pela Universidade do Contestado, Campus Concórdia, bolsista CNPQ/PIBIC, lanaflaviabaron@hotmail.com

²Pesquisador da Embrapa Suínos e Aves

³Analista da Embrapa Suínos e Aves

⁴Mestranda do Instituto Federal Catarinense - Campus Concórdia

Palavras-chave: IBV, aves, resposta imune.

INTRODUÇÃO

O vírus da bronquite infecciosa aviária (IBV) é um coronavírus e é altamente contagioso, se replicando principalmente em células epiteliais do trato respiratório superior, causando uma doença altamente infecciosa caracterizada por sinais respiratórios, reprodutivos e renais, dependendo do tropismo viral, e resulta em impacto econômico significativo para a indústria avícola em todo o mundo. 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 (1, 2). De fato, o grande número de cepas e variantes do IBV são rotineiramente apontados como causa de surtos em bandos vacinados. No entanto, a associação entre as respostas imunes locais induzidas pelo IBV e os mecanismos de evasão imune viral ainda não foram completamente elucidadas (3). O presente estudo permitiu investigar e comparar, por diferentes métodos, as respostas imunes precoces induzidas pela infecção com diferentes variantes de campo brasileiras do VBI em aves.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados quatro grupos de 30 pintinhos SPF (*Specific Pathogen Free*) cada, da linhagem *White Leghorn*. As aves foram alojadas em isoladores de pressão positiva, separados em grupo controle não desafiado (CN); grupo desafiado com estirpe respiratória não patogênica (NP, IBV-variante 448/1998); grupo desafiado com estirpe suspeita de ser nefrogênica (NF, IBV-variante 448/1998), e o grupo desafiado com estirpe respiratória patogênica (RP, amostra referência M41). As amostras de sangue foram coletadas entre 1 e 5 dias pós-infecção (dpi) e processadas no mesmo dia para análise por citometria. As células mononucleares do sangue foram isoladas através do gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences). Em seguida, as amostras foram incubadas com os seguintes 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 e analisadas em 50.000 eventos, por citometria de fluxo. Nos 5 dpi também coletou-se traqueia para análise de expressão gênica por RT-PCR em tempo real e amostras de rim para análise histológica e imunohistoquímica de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated digoxigenin deoxyuridine nick-end labeling*). A análise qualitativa e quantitativa de apoptose celular foi realizada por imunohistoquímica através da técnica TUNEL com o kit *ApopTag Plus Peroxidase in Situ Detection* (Cód. S7101, Chemicon, Billerica, USA). O RNA extraído da traqueia foi submetido à RT-PCR em tempo real para quantificação relativa da expressão de genes relacionados à resposta imune: inata (NF κ B, INF γ) e mediada por células (CD40 e CD80). Os resultados foram comparados pelo teste de Mann-Whitney, com nível de significância de $P < 0,05$. O cDNA foi obtido utilizando o kit High Capacity cDNA reverse transcription (Applied Biosystems) e realizou seqPCR utilizando SybrGreen.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com 1 d.p.i. a quantidade de monócitos fagocíticos no grupo controle foi maior que nos grupos desafiados (NP: $p < 0,05$; NF: $p < 0,01$ e RP: $p < 0,001$). Os grupos NF e RP apresentaram maior quantidade de APC ($p < 0,001$) que a CN. Em relação as células T, há um número maior de não ativadas nos grupos desafiados (NP: $p < 0,05$; NF: $p < 0,001$; e RP: $p < 0,001$). No entanto, as células TCD8 não ativadas foram reduzidas nos grupos desafiados NP ($p < 0,001$), NF ($p < 0,001$) e RP ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo controle. Não houve diferença significativa na quantidade de TCD4 e TCD8 circulantes ativados entre os grupos. Ao comparar as análises das populações celulares de 1 dpi e 5 dpi, observa-se que os grupos desafiados aumentaram significativamente na quantidade de monócitos circulantes ($p < 0,05$); enquanto a população de APCs não-monocíticas e linfócitos CD4 não ativados ocorreu uma redução. Como esperado, os linfócitos CD4 e CD8 ativados mostraram um aumento significativo nos grupos desafiados, um resultado que não foi observado em CN; ($P < 0,05$) e TCD8 + (NP: $p < 0,05$; NF: $p < 0,05$; RP: $p < 0,05$) significativamente maior que a CN em 5 dpi. Além disso, a população de linfócitos B nos grupos desafiados também aumentou em 5 dpi. Os resultados de expressão gênica corroboram com os resultados na citometria de fluxo, isto é, os resultados de expressão gênica foram semelhantes ao de expressão proteica. A expressão gênica de NF κ B, INF γ foi significativamente maior nos grupos desafiados em relação ao grupo negativo, demonstrando uma grande ativação da resposta imune, já que é um fator de transcrição que desempenha um papel crítico na

coordenação de ambas as respostas imunes inatas e adaptativas nas infecções. No entanto, nas análises de expressão gênica de marcadores de resposta imune celular ativada (CD40 e CD80) apresentam-se aumentados nos grupos desafiados em relação ao grupo negativo, embora sem diferenças significativas (Tabela 1). Nas análises histomorfológicas não foram observadas alterações significativas nos grupos desafiados quando comparado ao grupo CN. Entretanto, observamos uma maior taxa de apoptose celular no grupo RP do que CN (52,02% vs 4,71%), NP (13,72%) e NF (39,85%). Esses achados sugerem que o grupo desafiado com a variante altamente patogênica mostra uma lesão renal morfológica mais intensa (Figura 1).

CONCLUSÕES

Os resultados indicam que os marcadores de resposta imune celular selecionados no presente estudo podem desempenhar um papel importante na análise da indução de lesões na traqueia ocasionadas pelo IBV, e os seus níveis podem estar relacionados com a maior suscetibilidade à lesão renal secundária. Essa metodologia poderá ainda ser utilizada como técnica de avaliação de patogenicidade para estudos desse vírus. Observa-se também que diferentes tipos de células respondem aos desafios com cepas distintas apresentando variação de padrões celulares de resposta imune inata e adaptativa.

REFERÊNCIAS

1. CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Vet. Res.** 38, 281-297, 2007.
2. FRAGA, A. P. et al. Phylodynamic analysis and molecular diversity of the avian infectious bronchitis virus of chickens in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 31, p.77-83, mar. 2018.
3. MENDONÇA, J. F. P. et al. Bronquite infecciosa das galinhas: conhecimentos atuais, cepas e vacinas no Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 8, p.2559-2566, nov. 2009.

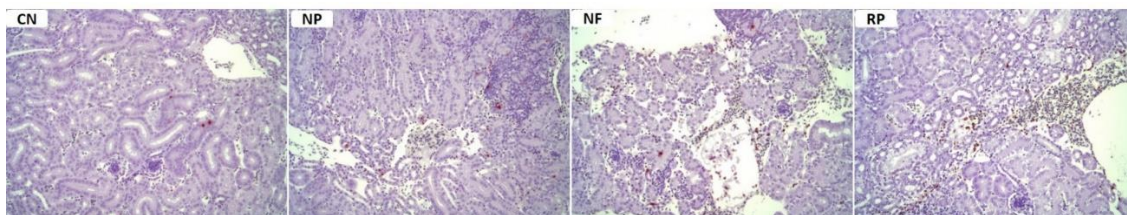


Figura 1. Imagens representativas da marcação para IBV em rim de aves dos grupos CN, NP, NF e RP ($n=10$). Aumento 200X.

Tabela 1. Delta CT de cada grupo para cada gene testado.

GRUPO	GENES			
	NFkb	INFy	CD40	CD80
CN	0,7052	0,0005	0,0348	0,0126
NP	1,1279	0,0311	0,0538	0,0225
NF	0,8205	0,0688	0,0547	0,0275
RP	0,8356	0,0312	0,0523	0,0100