

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

CÂMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

**RESPOSTAS MEDIADAS POR ANTICORPOS E CÉLULAS
T DE MEMÓRIA NA IMUNIDADE CONTRA O VÍRUS DA
BRONquite INFECCIOSA DAS GALINHAS**

Igor Leonardo dos Santos

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Agosto - 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

CÂMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

**RESPOSTAS MEDIADAS POR ANTICORPOS E CÉLULAS
T DE MEMÓRIA NA IMUNIDADE CONTRA O VÍRUS DA
BRONquite INFECCIOSA DAS GALINHAS**

Igor Leonardo dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Hélio José Montassier

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Agosto – 2009

S237r Santos, Igor Leonardo doso
Respostas mediadas por anticorpos e células T de memória na
imunidade contra o Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas / Igor
Leonardo dos Santos - - Jaboticabal, 2009
xiii, 83 f.; il.; 28 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: Hélio José Montassier
Banca examinadora: Antonio Carlos Alessi, Ricardo Luiz Moro de
Souza.

Bibliografia

1. Imunidade vacinal. 2. Isótipos de imunoglobulinas. 3. Imunidade
celular. 4. Mucosa traqueal. 5. Coronavírus aviário.

I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 619:616.988.73:636.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

IGOR LEONARDO DOS SANTOS –

Nascido em 17 de novembro de 1982, natural de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, formou-se em Medicina Veterinária em janeiro do ano de 2007, pela Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP/Jaboticabal. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica do Programa PIBIC/CNPq/UNESP de agosto de 2004 a julho de 2006, tendo desenvolvido o trabalho “Indução experimental da recombinação gênica entre as estirpes vacinal de campo do Vírus da Bronquite Infecciosa das galinhas em aves previamente vacinadas”. Ingressou no mestrado em março de 2007, na FCAV/UNESP/Jaboticabal no programa de Medicina Veterinária na área de Patologia Animal, com ênfase em ornitopatologia e imunologia aviária.

DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar a DEUS, pelo dom da vida, saúde, confiança, fé e pela presença constante nos momentos de alegria e nas horas difíceis da minha vida.

Aos meus pais e heróis, Paulo Roberto dos Santos e Maria José de Abreu Santos, pelos quais não existem palavras que expressem a gratidão e amor que tenho, por toda a força, incentivo, compaixão e exemplo de vida que me deram e continuam proporcionando todos os dias da minha vida.

Ao meu irmão Iuri Leonardo dos Santos, meu melhor amigo e fiel companheiro, pelo qual tenho muito orgulho, admiração, respeito e amor.

A minha “amada” Natacha Michelle Pirani dos Santos que me apoiou muito nesta fase da minha vida ficando sempre do meu lado, incentivando com frases e gestos que fizeram toda diferença na vitória desta difícil batalha, tornando-se assim mestre junto comigo.

Aos meus avôs (José e Paulo) e avós (Leonor e Hildes) que sempre me incentivaram com palavras, gestos e ensinamentos que eternamente serão lembrados.

Aos meus irmãos da República Arrankabaço por todos os momentos inesquecíveis que passamos juntos e principalmente pela amizade que com certeza levarei para sempre.

E aos demais familiares, agradeço por todo carinho e apoio...

AGRADECIMENTOS

Ao orientador, amigo e professor Hélio José Montassier, pela orientação e ensinamentos transmitidos com segurança, pela dedicação constante e principalmente pela confiança em mim depositada durante todo um ciclo na faculdade de graduação e mestrado, sendo com certeza o maior responsável pela minha formação acadêmica.

Aos amigos do Laboratório de Virologia e Imunologia, pela amizade, colaboração efetiva e pelo gostoso convívio: Aliandra, Patrícia (Tyta), Cibele, Renato, Vanessa, Andressa, Fátima, Aline Caetano, Daniel, Mariana, Camila, Ketherson e em especial, à técnica Maria de Lourdes Tamanini e à doutoranda Cíntia, pela amizade, dedicação e auxílios prestados.

A todos os docentes e funcionários da FCAV, pela amizade, apoio e ajuda em nosso conhecimento profissional.

A Merial pelos ovos fornecidos.

A Capes, obrigada pela bolsa concedida.

A Fort Dodge pelo auxílio prestado.

E a todos aqueles que de uma forma ou de outra participaram de minha formação, aqui omitidos, mas não esquecidos, o meu muito obrigado!

SUMÁRIO

Página

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE QUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	3
III. OBJETIVOS	19
3.1 Geral	19
3.2 Específicos.....	19
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Estirpes do VBIG empregadas	20
4.2 Propagação viral em ovos embrionados SPF	20
4.3 Determinação da Dose Infectante Embrionária 50% (DIE _{50%}) da estirpe M41 do VBIG.....	21
4.4 Infecção experimental em aves SPF	22
4.4.1 Infecção experimental em aves SPF com a estirpe M41.....	22
4.5 Padronização do teste de Sandwich-ELISA-ConA (S-ELISA-ConA) para mensuração dos isótipos IgG, IgM e IgA contra o VBIG	23
4.5.1 Controles positivos e negativos de soro sanguíneo e secreção lacrimal para uso no S-ELISA-ConA.....	23
4.5.2 Conjugados Imunoenzimáticos	24
4.5.3 Titulação em bloco dos imunoreagentes do S-ELISA-ConA para quantificação de anticorpos contra o VBIG em soro e secreção lacrimal.....	24
4.6 Avaliação da ciliostase dos anéis traqueais	26
4.7 Histopatologia.....	27
4.8 Extração do RNA genômico	28
4.9 'Primers'	29
4.10 Tratamento com DNase	30
4.11 Transcrição reversa (RT).....	30
4.12 Reação em cadeia da polimerase em tempo real	30
4.13 Detecção viral.....	32
4.14 Eletroforese em gel de agarose	32
4.15 Análise estatística	33
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Produção e titulação da estirpe M41 do VBIG.....	34
5.2 Padronização do S-ELISA-ConA.....	35
5.3 Resposta imune humoral no soro sanguíneo e secreção lacrimal, induzida pela vacinação ou não e pelo posterior desafio com o VBIG.....	35
5.3.1 Perfil cinético dos anticorpos anti VBIG dos isótipos IgG, IgM e IgA no soro sanguíneo.....	35

5.3.2 Perfil cinético dos anticorpos anti VBIg dos isótipos IgG, IgM e IgA na secreção lacrimal	39
5.4 Avaliação da expressão de genes de imune-resposta cito-mediadas e detecção de VBIg na traquéia de aves vacinadas ou não e desafiadas pela técnica de RT-PCR em tempo real	43
5.4.1 Especificidade dos 'primers' usados na detecção viral ou na avaliação da expressão dos genes de imune-resposta cito-mediada na traquéia de aves vacinada ou não e desafiadas pela técnica de RT-PCR em tempo real.....	43
5.4.2 Determinação da expressão gênica do marcador CD8+ da célula T	44
5.4.3 Determinação da expressão gênica da granzima A	48
5.4.4 Detecção viral na traquéia de aves desafiadas	52
5.5 Avaliação da proteção vacinal	55
5.5.1 Observações clínicas	55
5.5.2 Análise da ciliostase traqueal	56
5.5.3 Histopatologia.....	60
VI.CONCLUSÕES.....	69
VII.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

A/P: amostra positiva
BIG: Bronquite Infecciosa das Galinhas
C(T): "Threshold cycle"
DEPC: "Diethyl – pirocarbonate"
DO: densidades ópticas
DPI: dias pós-infecção
ELISA: "Enzyme Linked Immunosorbent Assay"
FAO: Organização para a Agricultura e Alimentação
FIV: Imunodeficiência Felina
GALT: "gut associated lymphoid tissue"
GH: glândula de Harder
GL: glândula lacrimal
HE: Hematoxilina/Eosina
HI: inibição da hemaglutinação
IHC: imuno-histoquímica
LCA: Líquido Córeo Alantóide
MALT: Tecido Linfóide Associado às Mucosas
OIE: Organização Mundial de Saúde Animal
OPD: Orto-Fenileno-Diamina
PCR: Reação da Polimerase em Cadeia
PBS: solução preparada em tampão fosfato
RCT: receptores de células T
RFLP: "Restriction Fragment Length Polymorphism"
RT: transcrição reversa
SIDA: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SPF: "Specific Pathogen Free"
TCB: tampão carbonato bicarbonato
VBIG: Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas
VN: vírus-neutralização

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1- Parâmetros de avaliação da ciliostase de anéis traqueais para avaliação do estado de proteção ao desafio com VBIG.....	27
Quadro 2- Parâmetros de avaliação dos anéis traqueais por histopatologia e respectivos escores.....	28
Quadro 3- Nomenclatura, número de acesso e procedência dos “primers” utilizados neste estudo e respectivos fragmentos amplificados.....	29
Quadro 4- Resultados da titulação da estirpe M-41, utilizados para cálculo de Reed & Muench.....	34

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1- Perfil cinético da concentração de IgG anti-VBIG detectados pelo S-ELISA-ConA no soro sanguíneo de aves não imunizadas e imunizadas.....	37
Figura 2- Perfil cinético da concentração de anticorpos do isótipo IgM anti-VBIG detectados pelo S-ELISA-ConA no soro sanguíneo de aves não imunizadas e imunizadas.....	38
Figura 3- Perfil cinético da concentração de anticorpos do isótipo IgA anti-VBIG detectados pelo S-ELISA-ConA no soro sanguíneo de aves não imunizadas e imunizadas.....	39
Figura 4- Perfil cinético da concentração de anticorpos do isótipo IgG anti-VBIG detectados pelo S-ELISA-ConA na secreção lacrimal de aves não imunizadas e imunizadas.....	41
Figura 5- Perfil cinético da concentração de anticorpos do isótipo IgM anti-VBIG detectados pelo S-ELISA-ConA na secreção lacrimal de aves não imunizadas e imunizadas.....	42
Figura 6- Perfil cinético da concentração de anticorpos do isótipo IgA anti-VBIG detectados pelo S-ELISA-ConA na secreção lacrimal de aves não imunizadas e imunizadas.....	43
Figura 7- Confirmação dos tamanhos esperados dos primers analisados pela técnica de RT-PCR em tempo real.....	44

Figura 8- . Comparação entre os resultados da expressão gênica do marcador CD8+ da célula T nos três grupos analisados em função dos tempos pós-desafio.....	45
Figura 9- Comparação entre os resultados da expressão gênica do marcador CD8+ da célula T no primeiro dia pós-desafio em aves não imunizadas e imunizadas.....	46
Figura 10- Comparação entre os resultados da expressão gênica do marcador CD8+ da célula T no quinto dia pós-desafio em aves não imunizadas e imunizadas.....	47
Figura 11- Comparação entre os resultados da expressão gênica do marcador CD8+ da célula T no décimo dia pós-desafio em aves não imunizadas e imunizadas.....	48
Figura 12- Comparação entre os resultados da expressão gênica da Granzima A nos três grupos analisados em função dos tempos pós-desafio.....	49
Figura 13- Comparação entre os resultados expressão gênica da Granzima A no primeiro dia pós-desafio em aves não imunizadas e imunizadas.....	50
Figura 14- Comparação entre os resultados expressão gênica da Granzima A no quinto dia pós-desafio em aves não imunizadas e imunizadas.....	51
Figura 15- Comparação entre os resultados expressão gênica da Granzima A no décimo dia pós-desafio em aves não imunizadas e imunizadas.....	52
Figura 16- Comparação entre os resultados da detecção do VBIG no quinto dia pós-desafio em aves não imunizadas e imunizadas.	54

Figura 17- Comparação entre os resultados de escores de ciliostase nos três grupos analisados em função dos tempos pós- desafio.....	57
Figura 18- Comparação entre os resultados de escores de ciliostase no quinto dia pós-desafio em aves não imunizadas e imunizadas.....	59
Figura 19- Comparação entre os resultados de escores de ciliostase no décimo dia pós-desafio.....	60
Figura 20- Comparação entre os resultados de escores da histopatologia nos três grupos analisados em função dos tempos pós-desafio.....	61
Figura 21- Comparação entre os resultados de escores da histopatologia no quinto dia pós-desafio em aves não imunizadas e imunizadas.....	62
Figura 22- Fotomicrografia de histopatologia com coloração hematoxilina-eosina, em aumento de 40x, de traquéia de ave do grupo 1 (não vacinado) no quinto dia pós-desafio.....	62
Figura 23- Fotomicrografia de histopatologia com coloração hematoxilina-eosina, em aumento de 40x, de traquéia de ave do grupo 1 (não vacinado) no quinto dia pós-desafio.....	63
Figura 24- Fotomicrografia de histopatologia com coloração hematoxilina-eosina, em aumento de 40x, de traquéia de ave do grupo 2 (vacina dose-diluída) no quinto dia pós-desafio.....	63
Figura 25- . Fotomicrografia de histopatologia com coloração hematoxilina-eosina, em aumento de 40x, de traquéia de ave do grupo 2 (vacina dose-diluída) no quinto dia pós-desafio.....	64

Figura 26- Fotomicrografia de histopatologia com coloração hematoxilina-eosina, em aumento de 40x, de traquéia de ave do grupo 3 (vacina dose-cheia) no quinto dia pós-desafio.....65

Figura 27- Fotomicrografia de histopatologia com coloração hematoxilina-eosina, em aumento de 40x, de traquéia de ave do grupo 3 (vacina dose-cheia) no quinto dia pós-desafio.....65

Figura 28- Comparação entre os resultados de escores da histopatologia no décimo dia pós-desafio.....66

RESPOSTAS MEDIADAS POR ANTICORPOS E CÉLULAS T DE MEMÓRIA NA IMUNIDADE CONTRA O VÍRUS DA BRONquite INFECCIOSA DAS GALINHAS

RESUMO - O vírus da bronquite infecciosa aviária (VBI) permanece como um dos principais problemas para a avicultura industrial. Para a imunoprofilaxia dessa virose existem vacinas “vivas” atenuadas ou inativadas, mas elas não são efetivas para o controle dessa doença infecciosa a longo prazo, especialmente contra estirpes variantes desse vírus. A função primordial das vacinas usuais contra o VBI são estimular as respostas imunes sistêmicas e locais, mediadas por anticorpos ou por células T efectoras. Com a finalidade de investigar os mecanismos envolvidos na imunidade protetora, os níveis de anticorpos locais e sistêmicos e a expressão de genes associados a respostas de linfócitos T citotóxicos, tais como o CD8 e a granzima A foi avaliada na mucosa traqueal, após a imunização primária de pintinhos de 1 dia de idade com vacinas atenuadas contra o VBI seguida do desafio 42 dias depois. Proteção ao desafio foi avaliada por meio da ciliostase traqueal, histopatologia e detecção de vírus pela técnica de RT-PCR em tempo real na traquéia. Os níveis de anticorpos no soro e na secreção lacrimal foram mensurados pelo Sandwich-Concanavalina A – ELISA. A expressão dos genes de CD8 e de granzima A foram avaliadas pela técnica de RT-PCR em tempo real. Os resultados demonstraram que a proteção contra a infecção pelo VBI em aves vacinadas se correlacionou com os níveis de anticorpos anti-virais específicos dos isótipos IgG, IgM e IgA na secreção lacrimal e com os níveis de expressão de CD8 e de granzima A. Concluindo, os resultados possibilitaram definir o perfil cinético do desenvolvimento das respostas imunes de memória contra o VBI na mucosa que é o sítio primário de replicação viral e indicaram que os mecanismos de imunidade humoral e celular podem ser muito importantes para a proteção de hospedeiros naturais contra a infecção pelo VBI.

Palavras-Chave: imunidade vacinal, isótipos de imunoglobulinas, imunidade celular, mucosa traqueal, coronavírus aviário.

ANTIBODY AND MEMORY T CELL RESPONSES IN THE IMMUNITY AGAINST AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS

SUMMARY - Avian infectious bronchitis (IBV) remains a major problem in the poultry industry. Live and inactivated vaccines are available, but they are not effective long term in controlling IBV infection, specially against variant strains. The essential function of existing IBV vaccines is to elicit, ideally, local and systemic specific antibodies, as well as cell-mediated immunity to this virus. To investigate the mechanisms of protective immunity, the levels of systemic and local specific antibodies and the expression of genes responsible for cytotoxic T cell killing such as CD8-marker and granzyme-A at tracheal mucosa was evaluated after the primary immunization of 1-day-old chicks with an attenuated avian infectious bronchitis virus (IBV) and challenge 42 days later. Challenge protection was evaluated by tracheal ciliostasis, histopathology and virus detection by real time RT-PCR. The serum and lachrymal anti-IBV antibody levels of IgG, IgM and IgM isotypes were measured with a Sandwich-ELISA Concanavalina-A method. The expression of CD8 and granzyme A genes were evaluated by real time RT-PCR. The results showed protection against challenge with the M-41. Lachrymal IgG, IgM and IgA anti-IBV specific antibodies and the levels of expression of CD8 and granzyme A genes correlated significantly with the protection to challenge. Overall, the results provided the kinetics on the development of memory mucosal immune responses against IBV at the primary replication site and indicate that tracheal humoral and cellular immune mechanisms may be very important in protecting natural hosts against IBV infection.

Key-words: vaccine immunity, immunoglobulin isotypes, cellular immunity, tracheal mucosa, avian coronavirus.

I. INTRODUÇÃO

A Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG) está incluída na lista da OIE (Organização Mundial de Saúde Animal) e FAO (Organização para a Agricultura e Alimentação) como doença transmissível de notificação anual, que tem importância sócio-econômica e implicações sanitárias relevantes, podendo trazer reflexos negativos a qualquer momento no comércio internacional de produtos derivados de aves.

No Brasil, a BIG está amplamente disseminada entre as criações avícolas comerciais e é uma das enfermidades virais que mais têm causado perdas econômicas, na atualidade. A principal medida profilática contra essa enfermidade tem sido a vacinação. Vacinas constituídas por vírus “vivo” atenuado contra a BIG têm sido administradas, como parte do esquema imunoprofilático, através de vias locais como a mucosa da conjuntiva ocular e/ou cavidade óculo-nasal, ou por meio de aerossol.

Com respeito às vacinas contra o Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (VBIG), sabe-se que os principais mecanismos de imunidade local e sistêmica são muito similares aqueles direcionados aos agentes infecciosos de superfícies mucosas, caracterizando-se, via de regra, por serem regulados independentemente e atuarem de forma ampla contra os diversos tipos de patógenos. Nesse contexto, foram relatadas, também, várias evidências, indicando que a vacinação via mucosa pode induzir tanto respostas imunes sistêmicas como nas mucosas, enquanto que a imunização por via parenteral ou sistêmica geralmente não ativa respostas imunes locais fortes. Em adição a isso, o desenvolvimento da imunidade da mucosa depende diretamente da interação de células locais com os agentes infecciosos. Embora as respostas imunes associadas às mucosas sejam cruciais para o desenvolvimento de imunidade de proteção dos organismos hospedeiros contra o desenvolvimento de doença clínica e até mesmo da morte causada por agentes infecciosos, os mecanismos efetores moleculares da imunidade associada às mucosas ainda não foram de todo elucidados.

No tocante especificamente à prevenção contra a BIG, já é fato reconhecido que ela se baseia principalmente na imunização das aves com vacinas vivas atenuadas

administradas por via das mucosas, como a intra-ocular, intra-nasal ou aerossol. E, nesse sentido, estudos dos mecanismos efetivos de imunidade protetora contra VBIg indicaram que tanto anticorpos locais dos isótipos IgA e IgG, como as células T citotóxicas locais (TCD8) exercem atividades relevantes ou no bloqueio da atividade infecciosa ou na eliminação do VBIg, tendo sido demonstrado que essas últimas células atuam de forma mais importante durante a fase inicial da infecção por esse vírus, ao passo que os anticorpos locais são essenciais nos mecanismos de imunidade nas fases subseqüentes da infecção.

Ainda, dentro desse contexto, foi verificado em dois estudos usando a técnica de transcriptoma e de RT-PCR quantitativa, que, nos tecidos da mucosa e submucosa traqueal de aves submetidas à infecção e/ou re-infecção com estirpe atenuada do VBIg, um grupo considerável de genes associados às respostas imunes, ou estavam hiper ou hipo-expressos, sendo que entre os mais ativos havia alguns relacionados à imunidade inata e outros à imunidade adquirida, especialmente aqueles envolvidos nas respostas de células T citotóxicas e na síntese de anticorpos do isótipo IgG.

No entanto, não foram ainda realizadas investigações dessa natureza em aves submetidas a esquemas convencionais de imunização e depois desafiadas com estirpes virulentas do VBIg, de forma a simular os testes clássicos da eficiência de vacinas contra esse vírus. Assim, torna-se de fundamental importância a compreensão dos mecanismos de imunidade celular e humoral, incluindo as respostas anamnéticas, tanto local como sistêmica, em aves vacinadas e posteriormente desafiadas contra esse patógeno viral, para que sejam melhores definidos os parâmetros mais relevantes, ou das respostas imunes humoral ou celular envolvidos no desenvolvimento da imunidade de proteção contra esse vírus nas aves vacinadas.

Em vista disso, não só se justifica como é importante a realização de estudos que objetivem compreender melhor os mecanismos de imunidade celular e humoral que são estimulados em aves vacinadas e desafiadas contra o VBIg, especialmente junto à traquéia, que é a porta de entrada e principal sítio de replicação desse vírus, para que sejam melhores definidos os parâmetros mais relevantes envolvidos no desenvolvimento da imunidade de proteção nas aves vacinadas.

II. REVISÃO DE LITERATURA

A Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG) é causada por um RNA-vírus de fita simples com polaridade positiva e que pertence à família *Coronaviridae* e ao gênero *Coronavirus*. Esses vírus são envelopados, pleomórficos, com um diâmetro médio de 120 nm, e têm grandes projeções de superfícies (20 nm), as espículas de envelope que são responsáveis pela aparência de coroa do virion á microscopia eletrônica (CAVANAGH, 2007).

O VBIG apresenta quatro proteínas estruturais, que foram identificadas como a glicoproteína de espícula (S), a glicoproteína integral de membrana (M), a proteína pequena de membrana (E) e proteína de nucleocapsídeo (N) (CAVANAGH, 2007). Dentre essas proteínas duas se destacam como os principais antígenos do VBIG; a glicoproteína S e a proteína N. A primeira é clivada pós-traducionalmente em duas subunidades: amino-terminal S1 e carboxi-terminal S2. A subunidade S1 está envolvida com a infectividade viral e contém epítomos vírus-neutralizantes, os quais são constituídos por determinadas seqüências de aminoácidos que conferem a especificidade de sorotipo a cada estirpe do VBIG e, ainda, apresenta sítios responsáveis pela atividade hemaglutinante do VBIG (CAVANAGH & NAQI, 2003). A proteína de nucleocapsídeo (N) se localiza na parte mais interna do vírion, encontrando-se diretamente associado com o RNA genômico viral (ribonucleoproteína RNP) e exerce, durante o ciclo de infecção intra-celular, um papel importante nos processos de replicação e montagem de novas partículas do VBIG. É uma proteína altamente imunogênica, sendo, por conseguinte capaz de induzir a produção de anticorpos específicos e de linfócitos T efetores específicos, sobretudo com ação citotóxica (SEO et al., 1997).

A BIG pode ser definida como sendo uma doença viral altamente contagiosa e de curto período de incubação, que acomete as galinhas causando uma doença respiratória que se manifesta clinicamente e invariavelmente por espirros e estertores tráqueo-bronquiolares e, às vezes, conjuntivite, sinusite, nefrite, nefrose, epididimite e

ovário-salpingite; causando, então, respectivamente, cabeça inchada, uremia, redução da fertilidade e da produção de ovos (CAVANAGH, 2007; DI FÁBIO e ROSSINI, 2000; CAPUA et al., 1999; DHINAKAR RAJ & JONES, 1997, 1996; CAVANAGH e NAQI, 1997; WANG et al, 1996; CUBILLOS et al., 1991).

O sistema de classificação das estirpes do Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (VBIG) pode ser dividido, com base na abordagem de procedimentos / análises, em dois grupos principais: (1-) os testes funcionais, os quais procuram avaliar importantes propriedades ou funções biológicas de uma estirpe ou de isolados desse vírus e (2-) os testes não funcionais, que buscam investigar e caracterizar o genoma viral. A classificação feita através de testes funcionais resulta na identificação de diferentes patotipos, protectotipos e tipos antigênicos do VBIG. Por outro lado, a classificação das estirpes do VBIG baseada na caracterização do genoma, resulta em genotipos virais (CAVANAGH, 2005; De WIT, 2000).

O patotipo é definido, essencialmente, pelo tropismo de uma estirpe do VBIG por um tipo particular de células ou de tecidos, ou ainda de órgãos e pelas lesões predominantes que são induzidas por esse mesmo vírus no organismo hospedeiro natural. Ainda, deve ser considerado nesse último caso que, algumas vezes, a replicação desse vírus em um dado tipo celular ou tecidual, não desencadeia alterações patológicas significantes (CAVANAGH, 2005; CAVANAGH e NAQI, 2003). Os protectotipos do VBIG são obtidos a partir de dados a respeito da eficiência de uma determinada formulação vacinal desse mesmo vírus para se conseguir determinar qual é a estirpe vacinal com maior capacidade de induzir efetiva proteção cruzada contra cada uma nova estirpe ou isolado de campo, caracterizando, assim, o protectotipo desse novo vírus. A tipagem antigênica faz a caracterização do sorotipo ou do "epitotipo" de uma dada estirpe viral, usando anticorpos vírus-específicos policlonais ou monoclonais, respectivamente (De WIT, 2000).

A BIG está incluída na lista da OIE (Organização Mundial de Saúde Animal) e FAO (Organização para a Agricultura e Alimentação) como doença transmissível de notificação anual, que tem importância sócio-econômica e implicações sanitárias, podendo trazer alguma repercussão a qualquer momento no comércio internacional de

produtos e animais. Essa enfermidade ocorre em, praticamente, todas as regiões do mundo onde existe avicultura industrial, sendo extremamente difícil o seu controle devido a existência de múltiplos sorotipos e variantes do vírus, que podem não responder à proteção cruzada total (CAVANAGH e NAQI, 2003; DI FÁBIO e ROSSINI, 2000; CAPUA et al., 1999). A enfermidade foi descrita pela primeira vez em Dakota do Norte, nos Estados Unidos, em 1930. No Brasil, identificada pela primeira vez em 1957 por HIPÓLITO (HIPÓLITO et al., 1973; HIPÓLITO, 1957).

No Brasil, a BIG tem ocorrido com grande frequência na Serra Gaúcha, Oeste de Santa Catarina, Sudoeste, Oeste e Norte do Paraná, além do Sul e Norte de São Paulo e Triângulo Mineiro. Várias empresas têm relatado grandes prejuízos causados pelo aumento de problemas respiratórios e de lesões musculares em frangos de corte com mais de 28 dias de idade, causando importantes perdas por condenação total ou parcial carcaça no momento do abate (ASSAYAG, 2004).

A patogenia do VBIG é variável, em termos de tropismo tecidual, mas no geral, é bastante freqüente o acometimento, em maior ou menor grau, do trato respiratório. Independentemente do tropismo final, o VBIG infecta, inicialmente, o trato respiratório superior, especialmente para as células epiteliais ciliadas para as células secretoras de muco. Os títulos infectantes do vírus atingem níveis máximos na mucosa nasal e na traquéia depois de três dias da infecção, permanecendo nesses patamares por mais dois a cinco dias. Títulos similares do vírus ocorrem nos pulmões e nos sacos aéreos. Áreas pequenas de pneumonia são observadas nos pulmões, embora o VBIG não seja considerado um típico causador de pneumonia (CAVANAGH, 2007).

Na dependência da estirpe viral, espécie e idade das aves e das condições ambientais, o indivíduo acometido pode não apresentar sinais clínicos e lesões respiratórias. Assim, a patogenia da infecção pelo VBIG se caracteriza pela invasão e infecção inicial no epitélio traqueal, seguida de viremia, o que contribui para sua disseminação para os órgãos viscerais, onde pode ou não persistir e para a gênese de lesões locais, ou até mesmo sistêmicas. Geralmente, a infecção de tecidos entéricos não se manifesta clinicamente. O VBIG se replica em muitos outros tipos de células epiteliais, incluindo as do rim, do oviduto, dos testículos e de diversas partes do trato

gastrointestinal, como o esôfago, o proventrículo, o duodeno, o jejuno, a Bursa de Fabricius, além das tonsilas, do reto e da cloaca (CAVANAGH, 2007; CAVANAGH e NAQI, 2003; DI FÁBIO e ROSSINI, 2000; DI FÁBIO, 1993).

A transmissão do VBIG ocorre através do contato direto ou indireto entre a ave doente ou mesmo infectada e assintomática e as aves sadias, sendo infectado primeiramente o tecido epitelial do trato respiratório superior. Aves de todas as idades são susceptíveis, embora a doença seja mais severa em aves jovens, nas quais este vírus pode causar uma mortalidade significativa (CAVANAGH e NAQI, 2003; DI FÁBIO e ROSSINI, 2000; DI FÁBIO, 1993).

A BIG se manifesta sob quatro formas clínicas e anatomopatológicas diferentes. Quando são acometidas aves durante as primeiras semanas de vida, são mais comuns os sintomas respiratórios caracterizados por espirros e estertores úmidos da traquéia, morbidade e mortalidade elevadas. Nas poedeiras e reprodutoras, a enfermidade ocasiona queda de postura (5% a 30%) e/ou produção de ovos defeituosos (casca mole, rugosa e despigmentada), sem, entretanto, haver uma mortalidade significativa. Nos frangos de corte, pode ocorrer sob a forma de nefrite-nefrose, havendo aumento acentuado dos rins, diarreia aquosa e morbidade e mortalidade variáveis (5% a 20%). Ainda, nas poedeiras e reprodutoras, durante a fase de recria, pode haver a manifestação tardia de urolitíase e a completa atrofia renal, sendo que a morbidade e a mortalidade são variáveis (2% a 10%) (CAVANAGH e NAQI, 2003; DI FÁBIO e ROSSINI, 2000; SILVA, 1989).

As lesões observadas através de histopatologia de traquéias de aves acometidas pela BIG são: presença de edema, perda ciliar, descamação de células epiteliais e infiltração de heterófilos e linfócitos 18 horas após a infecção. A regeneração do epitélio começa em 48 horas. A hiperplasia é seguida de infiltração massiva da lâmina própria por células linfocitárias e formação de um grande número de centros germinativos, que podem estar presentes até sete dias pós-infecção (dpi). Se há acometimento dos sacos aéreos, ocorre edema, descamação de células epiteliais e presença de exsudato fibrinoso em 24 horas. O aumento de heterófilos pode ser observado tardiamente (CAVANAGH e NAQI, 2003; DI FÁBIO e ROSSINI, 2000; DI FÁBIO, 1993).

Em 2004, Boltz et al. confirmaram a associação entre a BIG e a redução da fertilidade em machos reprodutores. Nesse estudo foram encontradas pedras epididimais em 75% das aves vacinadas com o sorotipo Massachusetts vacinal (H-120) enquanto aves não vacinadas não apresentaram esta alteração. As aves afetadas apresentaram redução no peso testicular, na produção espermática e na concentração sérica de testosterona.

Em matrizes pesadas e aves de postura comercial, têm sido observado um aumento significativo dos problemas de “cabeça inchada”, peritonites e salpingites resultantes de infecções secundárias à BIG que, em alguns casos, são acentuadas por uma maior susceptibilidade aos quadros de enterite. Todos estes casos descritos acarretam um aumento no consumo de antibióticos, elevando as perdas financeiras, além de dificultar o manejo para se conseguir cumprir o período máximo permitido para a retirada desses fármacos antes do abate, o qual foi estabelecido e/ou é recomendado pela legislação em vigor. Assim, deve ficar claro que a BIG está presente em grande parte das empresas avícolas brasileiras e, provavelmente, é a enfermidade viral que tem causado perdas econômicas mais relevantes na atualidade (ASSAYAG, 2004).

Os métodos de diagnóstico convencionais do VBIG são baseados no isolamento viral em ovos embrionados “Specific Pathogen Free” (SPF) (OWEN et al., 1991; GELB, 1989) ou em culturas celulares (HOPKINS, 1974), seguidos da identificação antigênica dos isolados. Três ou mais passagens em ovos embrionados são geralmente necessárias para o isolamento primário do VBIG, o que torna tais procedimentos mais onerosos e demorados. É conhecido, também, que somente estirpes adaptadas à passagem em ovos induzem nanismo embrionário evidente, e que alguns isolados de campo do VBIG não apresentam lesão durante várias passagens (RAJ et al., 2004).

Uma outra alternativa é o isolamento do VBIG a partir da inoculação em anéis traqueais de embriões SPF, a qual se revelou uma técnica bastante sensível (COOK et al., 1976), mas também muito laboriosa e demorada. Esse método pode ser associado à reação de imunofluorescência direta em culturas de órgão traqueal, permitindo a detecção mais rápida do VBIG (BHATTACHARJEE et al., 1994).

O VBIG também pode ser detectado diretamente em tecidos de aves infectadas por meio de técnicas de imunohistoquímica (IHC) ou por hibridização “in situ” (COLISSON et al., 1990; HANDBERG et al., 1999).

Os métodos sorológicos mais utilizados no diagnóstico da BIG são inibição de hemaglutinação (HI), vírus-neutralização (VN) (CAPUA et al., 1999) e o ensaio imunoenzimático “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) com anticorpos monoclonais ou policlonais. Vários ensaios imunoenzimáticos foram desenvolvidos e aplicados no diagnóstico laboratorial da BIG. O ELISA apresenta a vantagem de sobrepujar os demais métodos sorológicos em virtude do seu baixo limiar de detecção, associado à capacidade de oferecer resultados mais objetivos e reprodutíveis, permitindo assim, a classificação mais rápida das amostras analisadas em níveis de reação imunoenzimática, possibilitando o acompanhamento do grau de imunidade humoral local e sistêmica de um grande número de aves vacinados contra o VBIG (CARDOSO et al. 1996a; CARDOSO et al. 1996b; IGNJATOVIC e ASHTON, 1996; NAQI et al., 1993; ZELLEN e THORSEN, 1986; GARCIA e BANKOWSKI, 1981).

A utilização de lectinas em métodos de ELISA tem sido aplicada com sucesso para capturar antígenos glicoprotéicos de diversos agentes infecciosos, dentre eles o vírus do câncer pancreático, vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e vírus da Imunodeficiência Felina (FIV). As lectinas são glicoproteínas estáveis derivadas de plantas, animais ou microorganismos, que interagem, especificamente com os carboidratos, em especial monossacarídeos que estejam presentes na superfície das células eucarióticas, procarióticas e vírus. Em 1980, Lancer e Howard descobriram que a lectina Concanavalina A (ConA) radiomarcada era capaz de combinar-se com as glicoproteínas S e M do VBIG, pelo fato de possuírem oligossacarídeos compostos, principalmente os monossacarídeos manose e glicose, expostos na superfície dessas moléculas e que se constituem alvo para a ligação com essa lectina. Bronzoni et al. (2001) desenvolveram e padronizaram um ensaio de ELISA utilizando a ConA como reagente de captura para ser utilizado na detecção do VBIG em líquido alantóide ou em tecidos infectados com a estirpe M-41 desse mesmo vírus. Posteriormente, foi desenvolvido o método “Sandwich” ELISA Concanavalina A para a detecção de

anticorpos IgG contra o VBIg, testado com estirpes homólogas e heterólogas (BRONZONI et al., 2005, 2001).

As técnicas de biologia molecular constituem, por sua vez, em um meio de diagnóstico rápido, preciso e específico na detecção do VBIg. A reação em cadeia da polimerase antecedida pela transcrição reversa (RT-PCR) é uma ferramenta muito útil na detecção de diversos RNA-vírus (CAVANAGH, 1993). No caso do VBIg, por ser um RNA-vírus, a PCR foi aplicada pela primeira vez de forma bem sucedida depois que o genoma viral foi transformado, por meio da reação de transcrição reversa (RT) em cDNA (JACKWOOD et al., 1992).

Tradicionalmente, a técnica de vírus neutralização realizada em ovos embrionados foi utilizada para identificar os diferentes sorotipos do VBIg. No entanto, hoje a técnica de RT-PCR pode ser rotineiramente utilizada com o objetivo de discriminar diferentes estirpes do VBIg (KEELER et al., 1998; JACKWOOD et al., 1997; KWON et al., 1993). Além disso, deve ser destacado que um rápido teste de avaliação do polimorfismo gênico que ocorre entre estirpes do VBIg, pode ser feito sobre produtos amplificados do gene S submetidos a uma digestão (clivagem) com algumas enzimas de restrição, processo esse que gera fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, de acordo com a presença ou a ausência de determinados sítios para cada uma das enzimas utilizadas, constituindo; dentro de uma técnica conhecida como Polimorfismo de Tamanhos de Fragmentos Gerados por Digestão com Enzimas de Restrição ("Restriction Fragment Length Polymorphism"-RFLP) (JACKWOOD et al., 1997; KWON et al., 1993).

O advento do método de PCR em tempo real trouxe a possibilidade de se usar uma ferramenta de diagnóstico ainda mais rápido em relação à técnica de PCR convencional, com um aumento no índice de sensibilidade e reprodutibilidade. Houve, também, uma redução no risco de contaminação do ambiente por manipulação do produto amplificado, já que, a PCR em tempo real permite a simultânea amplificação e detecção da seqüência gênica alvo amplificado, através do uso de marcadores fluorescentes, além de evitar manipulações adicionais na técnica de eletroforese e a

exposição ao brometo de etídeo (CALLISON et al., 2006; NIESTERS, 2004; MACKAY et al., 2002).

A avaliação do estado de proteção, após vacinação, tem sido realizada por meio do desafio seguido do re-isolamento viral de suabes de materiais traqueais colhidos do quinto ao sétimo dpi, ou pelo monitoramento da evolução dos sinais clínicos, histopatológicos e da integridade do movimento ciliar das células epiteliais da traquéia (KING e CAVANAGH, 1991).

O monitoramento dos sinais clínicos, como espirros, corrimento ocular e nasal, estertores e depressão, é um dos meios de avaliação do estado de proteção ao desafio. Cabe ressaltar que a observação clínica é subjetiva necessitando de outros parâmetros de avaliação como ciliostase traqueal, histopatologia e re-isolamento viral.

A técnica da ciliostase demonstrou uma correlação excelente com o isolamento viral da traquéia, quanto à proteção ao desafio com estirpe homóloga e heteróloga do VBIG (MARQUARDT et al., 1982). Darbyshire e Peters (1985) observaram que a proteção estava associada à habilidade de uma estirpe vacinal de VBIG em conferir resistência na traquéia frente ao desafio com outra estirpe, que se tornaria incapaz de induzir completa ciliostase no epitélio traqueal. É possível ainda, avaliar a ciliostase com a atribuição de escores (DI FABIO et al., 2000; ANDRADE et al., 1982) já que normalmente existe algum grau de proteção cruzada entre estirpes distintas o que resultaria em ciliostase parcial.

No que diz respeito às alterações provocadas pelo VBIG, a histopatologia é uma ferramenta importante na avaliação do estado de proteção na medida em que revela a severidade da lesão tecidual causada pelo VBIG. Estirpes patogênicas com tropismo para o trato respiratório induzem várias alterações patológicas. Tais alterações traqueais incluem exsudato seroso e catarral, espessamento da mucosa, descamação do epitélio ciliar e glandular com substituição por um epitélio estratificado não diferenciado e infiltração inflamatória (BUTCHER et al, 1989).

A proteção dos organismos hospedeiros contra os agentes infecciosos depende essencialmente de mecanismos inatos (inespecíficos) e dos adquiridos (específicos). A imunidade inata, por sua vez, compreende o conjunto de mecanismos inespecíficos de

resistência à invasão de agentes externos, tais como as barreiras físicas (pele e mucosas), químicas (secreções de pele e mucosas) e biológicas (microbiota) e as respostas inflamatórias, com destaque para a ação de fagócitos. Os fagócitos polimorfonucleares (heterófilos nas aves) constituem a primeira linha de defesa mais efetiva contra esses agentes e são as primeiras células enviadas para o sítio de infecção, iniciando a resposta inflamatória (MONTASSIER, 2000). Em infecções pelo VBI, os heterófilos são as células inflamatórias mais numerosas encontradas nos fluidos nasais e traqueais (FULTON et al., 1993). Dhinakar e Jones (1997) reportaram a importância dessas células em limitar a replicação do VBI, não atuando diretamente na replicação, mas contribuindo para manter o epitélio traqueal íntegro.

A imunidade adquirida resulta da ativação de mecanismos efetores antígenos-anticorpos, incluindo células B (resposta imune humoral) e de células T (resposta imune celular) levando a maior ativação de macrófagos e produção de células B e T de memória. As aves desenvolvem uma boa resposta humoral após a infecção pelo VBI, que pode ser mensurada pelo ELISA, pelos testes de inibição da hemaglutinação e de vírus-neutralização (De WIT et al., 1992). Ainda, no que diz respeito à imunidade humoral adquirida das aves contra o VBI, tanto local (secreção lacrimal) quanto sistêmica (soro sanguíneo), já foram relatados que há respostas, em níveis variados, de anticorpos anti-virais específicos dos isótipos IgG, IgM e IgA em diferentes etapas da resposta imunológica das aves (TORO et al., 1997).

As aves não possuem, de fato, propriamente uma imunoglobulina igual a IgG dos mamíferos, sendo que a imunoglobulina encontrada em maior quantidade na circulação sanguínea das aves é denominada IgY, que seria, na evolução, o isótipo ancestral de IgG e IgE (AMBROSIUS e HADGE, 1987). Embora não seja rigorosamente correto, a nomenclatura IgG é comumente utilizada para designar IgY, que representa o anticorpo de eleição em testes sorológicos para o monitoramento de infecções pelo VBI em aves vacinadas. A detecção de IgG pode ocorrer a partir do quarto dpi, atingindo seu pico de concentração aos 21 dias, podendo persistir altos títulos por várias semanas (MOCKETT e DARBYSHIRE, 1981).

Os anticorpos anti-VBIG do isótipo IgM estão presentes em infecções recentes, atingindo um pico de concentração em torno de oito dias pós infecção, declinando posteriormente (MOCKETT e COOK, 1986). Aves que recebem vacina viva via ocular apresentaram títulos altos de IgM demonstrando que este isótipo é extremamente relevante no diagnóstico de infecções recentes (MARTINS et al., 1991).

O isótipo IgA é encontrado em grande concentração na vesícula biliar, podendo ser secretado a julgar pela habilidade de ser transportado do sangue para a bile via hepatobiliar (AMBROSIUS e HADGE, 1987). Ainda, com relação ao papel dos diferentes isótipos de anticorpos na imunidade contra o VBIG, foi relatado que os níveis de anticorpos do isótipo IgA, presente na secreção lacrimal de aves vacinadas, estão diretamente associados ao estado de resistência específica ao desafio (TORO e FERNANDES, 1994). Assim, foi verificado, nesse estudo as aves que proporcionaram um menor isolamento viral pós-desafio eram as do grupo vacinado e que apresentavam níveis maiores de anticorpos desse isótipo pelo ELISA, demonstrando uma forte associação entre os níveis de anticorpos anti-virais específicos do isótipo IgA na secreção lacrimal e o grau de proteção contra a infecção pelo VBIG, o que pode ser considerado, portanto, um indicador apropriado para a definição do perfil de um lote quanto ao real estado de proteção.

Estudos sobre os mecanismos de imunidade induzidos pelas vacinas contra o VBIG têm mostrado a relação da resposta imune humoral com a proteção. Contudo, ainda é necessário estabelecer melhor a correlação entre os níveis de anticorpos com a resistência e a possibilidade de co-existir re-excreção do vírus com a presença de altos títulos de anticorpos circulantes (JONES e AMABALI, 1987), o que sugere que, além da resposta imune humoral, outros mecanismos imunológicos são envolvidos.

A imunidade local parece ser um importante fator na resistência à BIG. Aves, que se recuperam da doença, quando inoculadas com vírus de baixa passagem em embrião, mostram-se resistentes por um período relativamente curto, mesmo que os anticorpos circulantes estejam presentes em baixa concentração ou ausentes (HOFSTAD, 1976).

A imunidade local, no trato respiratório, é de fundamental importância na proteção contra o VBI (HAWKES et. al., 1983). Anticorpos específicos contra o VBI das classes IgA e IgG, têm sido encontrados em lavados traqueais de aves infectadas (DHINAKAR e JONES, 1996) e células secretoras de anticorpos estão presentes nos tecidos de anéis de traquéia (NAKAMURA et.al., 1991). Há, no entanto, algumas controvérsias, pois, no início das investigações sobre esse tema, Johnson et al. (1969) não foram capazes de demonstrar resistência local da traquéia à infecção, enquanto que Holmes (1973), Toro et al. (1996) e Gelb et. al. (1998) conseguiram encontrar anticorpos neutralizantes nos lavados nasais após imunização.

Investigações anteriores relataram que todas as vias de aplicação das vacinas "vivas" atenuadas contra a VBI resultaram em aumento de IgA no fluido lacrimal pelo fato de existir um sistema imune comum associado às mucosas (Tecido Linfóide Associado às Mucosas – MALT) e especificamente em razão da glândula de Harder (GH) e da glândula lacrimal (GL), que tem revelado a sua importância em produzir respostas imunes adaptativas e conferir proteção imune específica junto às mucosas oculares e do trato respiratório superior (MONTGOMERY et al., 1997, TORO et.al., 1997).

Ainda, foi relatado que a estimulação antigênica, em uma mucosa do organismo hospedeiro, pode induzir a geração de células secretoras de anticorpos antígeno-específicos da classe IgA para outro sítio de mucosa localizado em local distante daquela em que foi estimulada (SAIF et al., 1995). Nesse sentido, foi verificado que o VBI, que se replicava em células intestinais, ativa os linfócitos do tecido linfóide associado ao intestino (GALT-"gut associated lymphoid tissue") que podiam migrar, por exemplo, para o tecido linfóide associado à cabeça, onde passou a produzir anticorpos específicos contra o VBI (TORO et.al., 1997).

Algumas pesquisas têm revelado a presença da produção local de anticorpos específicos contra o VBI no trato respiratório superior de aves, indicando a sua importância no combate deste patógeno (TORO et. al., 1997; TORO e FERNANDEZ, 1994; LUTTICKEN et al., 1987). Nesse sentido, Jeurissen et. al. (1994) observaram que a concentração de anticorpos IgG na lágrima excedeu os níveis de IgA e IgM,

levando esses autores a suporem a ocorrência de uma resposta imune primária de IgG para o VBIg, enquanto que para Toro e Fernandez (1994) os anticorpos da classe IgA, na secreção lacrimal, estão mais diretamente associados com a imunidade específica contra o VBIg, uma vez que se correlacionaram mais com o estado de proteção ao desafio, do que os anticorpos da classe IgG. A resposta de IgG tem sido demonstrada em níveis altos e é detectada por períodos mais longos, pós-infecção, enquanto que a concentração de IgA tende a permanecer baixa ou estar presente por curto intervalo de tempo, após o estímulo imunizante (LUTTICKEN et. al., 1987).

Acredita-se que a persistência da infecção por esses vírus vacinais, na glândula de Harder, seja um dos principais fatores responsáveis pela indução de respostas imunes elevadas e duradouras junto às mucosas óculo-nasais e, por conseguinte, uma capacidade maior e mais prolongada de conferir um estado de proteção contra a infecção local (TORO et al., 1996; RUSSEL, 1993). Ainda, o estudo do papel da imunidade na superfície da traquéia das aves contra o VBIg, revelou que ela exerce uma função de destaque na resistência à infecção por esse patógeno. Nesse contexto, foi constatado que a resposta de anticorpos locais, em aves, tem provado sua importância, quando antígenos vacinais são administrados por vias locais, como a óculo-nasal, água de beber e aerossol. A síntese local de anticorpos e a reação histológica para o VBIg em órgãos imunocompetentes como a Glândula de Harder (GH) têm sido reportadas em aves vacinadas com esse vírus (TORO et al., 1996; BABA et al., 1990; DAVELAAR et al., 1982). Ainda, segundo Toro et al. (1997) a GH é o tecido linfóide que mais contribui para a produção de anticorpos locais, que exercem importante papel na proteção da mucosa óculo-nasal, pois além de sintetizar IgA local, esse órgão promove a transferência IgG do compartimento sangüíneo para a secreção lacrimal.

Foi demonstrado também a importância dos anticorpos das classes IgA e IgG em impedir de forma efetiva a infecção pelo VBIg no trato respiratório superior (ZAVALA, 1999; GELB et al., 1998). Neste sentido, Cook et al. (1992), mostraram que títulos de anticorpos em lavados traqueais foram similares aos da secreção lacrimal. Variações dos níveis de IgG no soro e IgA na lágrima têm sido demonstradas em diferentes

linhagens de aves, após a vacinação ocular contra o VBI (TORO et.al., 1996). A linhagem Leghorn branca apresenta uma significante alta nos níveis de anticorpos e uma resposta mais homogênea de IgG no soro entre o 5 e 9º dia pós-infecção e a resposta de IgA no fluido lacrimal entre 5-14 dias pós-infecção em matrizes pesadas.

Estudos do papel da imunidade mediada por células na proteção contra o VBI são muito mais limitados do que aqueles referentes à imunidade humoral. A proliferação de células T antígenos-específicas em infecções pelo VBI ou em aves vacinadas têm sido demonstrados, assim como, em algumas aves, foi revelada a existência de uma correlação positiva entre a resposta linfoproliferativa de linfócitos T e a resistência ao desafio (TIMMS e BRACEWELL, 1983). Nesse mesmo contexto, Janse et al. (1994) mostraram que a imunidade local na traquéia é mediada por células T. Células CD4 e CD8 são observadas em secções de traquéia e pulmão de aves infectadas com o VBI (DHINAKAR RAJ e JONES, 1996).

Além disso, foi verificado que interações entre os mecanismos de imunidade inata e adaptativa são fundamentais para o desenvolvimento de uma resposta imune eficiente contra os diversos agentes infecciosos. Os anticorpos naturais constituem a primeira classe de anticorpos produzidos durante uma resposta primária, pertencendo principalmente à classe IgM. Ainda, apresentam baixa afinidade e mantêm a vantagem de reconhecer amplamente estruturas próprias e não próprias ao organismo, apresentando assim uma alta reatividade cruzada. Os anticorpos naturais têm um papel relevante como primeira linha de defesa, na medida em que se ligam a patógenos invasores resultando na ativação do complemento e confinamento dos complexos imunes nos órgãos linfóides, promovendo a depuração do antígeno com ação conjunta de macrófagos. Os anticorpos naturais agem também sinergicamente com a IgG, por meio da ativação do sistema complemento, direcionando ao desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa (BOES, 2000 ; KANTOR e HERZENBERG, 1993).

Ainda no tocante à resposta imunológica das aves frente ao VBI, torna-se evidente que qualquer estratégia vacinal que induza proteção contra diversas estirpes sorologicamente distintas de VBI seria bem-vinda. As respostas imunes humorais, avaliadas usualmente através da mensuração de anticorpos específicos contra epítopos

do VBIg já estão bem conhecidas. No entanto, estudos cujo foco principal seja direcionado para os mecanismos imunes celulares que eliminam células infectadas ainda são escassos e não são completamente elucidativos (NIESTERS, 1987, CAVANAGH, 2007). Embora exista tal defasagem frente á resposta imune celular das aves, sabe-se que linfócitos T citotóxicos têm-se mostrado como o maior responsável pelo controle de infecções virais em mamíferos (STOHLMAN, 1995). A ativação da atividade citolítica pelo linfócito T efetor requer contato direto com a célula apresentadora de antígeno, as quais têm como alvo a lise de células infectadas com o vírus através da expressão endogenicamente dos antígenos da superfície celular. Os receptores de células T (RCT) reconhecem como estranhos somente pequenos peptídeos virais associados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Entretanto, os perfis de expressão de genes associados à regulação e o desenvolvimento dos mecanismos de imunidade antígeno-específica contra o VBIg junto às mucosas não são bem definidos (GUO et al., 2008).

A maioria dos linfócitos T citotóxicos em aves tem sido reportada como sendo CD8+ embora limitada atividade citolítica tenha sido demonstrada por linfócitos T CD4+. No caso de ativação dos linfócitos T citotóxicos CD8+, o peptídeo deve ser apresentado para as células receptoras de antígenos no contexto da molécula de histocompatibilidade principal de classe I (MHC classe I) do antígeno. O sucesso das interações depende no MHC de classe I com o peptídeo antigênico na habilidade de compatibilizar os linfócitos T citotóxicos e o alvo das células apresentadoras de antígenos. Portanto, uma máxima ativação dos linfócitos T citotóxicos depende da expressão endógena da proteína com células que são idênticas as MHC de classe I do antígeno (COLLISSON et al., 2000).

Respostas de linfócitos T citotóxicos descritos em galinhas assemelham-se muito às respostas efetuadas pelas células T análogas de mamíferos, embora somente estudos limitados tenham sido descritos em galinhas. Além disso, estudos versando sobre linfócitos T citotóxicos específicos para o VBIg foram realizados somente com a utilização de galinhas de linhagens isogênicas com MHC idênticos (haplótipos), as quais foram avaliadas para a transferência adotiva de linfócitos (SEO et al., 1997).

Ainda, as células T CD8⁺ reconhecem antígenos virais em associação a moléculas MHC (complexo principal de histocompatibilidade) da classe I e uma das vias de sua diferenciação requer citocinas produzidas por células T CD4⁺ (ABBAS e LICHTMAN, 2005; CLOUGH e ROTH, 1997).

No curso das infecções virais, os marcadores de linfócitos T citotóxicos como a Granzima A, que também podem ser liberadas por células NK, atuam como um mecanismo de destruição de células alvo infectadas por vírus. A lise decorre, na sua maior parte, da ação de granzima A, da granzima-B, e também da atividade das perforinas. Uma vez que a integridade da membrana celular seja perturbada pelas perforinas, as granzimas destroem as proteínas nucleares (GÖBEL et al., 2001). A Granzima A é um importante efetor de células NK e principalmente de linfócitos T citotóxicos atuando na lise de células alvos através da reação de espécie oxidativa e perda do potencial da transmembrana mitocondrial (PARDO et al., 2004). Foi demonstrado na infecção pelo vírus da doença de Marek (VDM) que a possível elevação da expressão gênica da granzima A durante a infecção por esse vírus está relacionada às células NK e com as atividades de linfócitos T citotóxicos, que atuam para eliminar as células infectadas com esse vírus (SARSON et al., 2006).

Em estudos sobre a avaliação das respostas imune na traquéia de galinhas que foram inoculadas ou com amostra virulenta ou com amostra atenuada (vacinal) do VBI foi demonstrada a expressão de alguns genes importantes associados as respostas imunes (GUO, et al., 2008; COLISSON et al., 2003). Além disso, um outro estudo foi realizado com o objetivo principal de avaliar a expressão de genes de imune-resposta, bem como para mensurar a infiltração de linfócitos TCD4 e TCD8 e de macrófagos, em vários órgãos alvos da infecção por esse vírus e por *Escherichia coli*, como a traquéia, os sacos aéreos, o baço e o pulmão (ARIAANS et al, 2008; MATTHIJS, et al., 2009). Contudo, nenhum estudo ainda foi realizado para avaliar tais parâmetros de imunidade celular e humoral em aves vacinadas com preparações comerciais vivas atenuadas por via mucosa, ao 1º dia de idade e desafiadas 6 semanas depois, no sentido de se determinar os níveis dessas respostas imunes e relacioná-los com o estado de proteção

ao desafio nas aves previamente imunizadas, caracterizando-se, dessa forma, os perfis das respostas de memória dessas duas modalidades de imunidade.

Diante de todo o exposto, fica evidenciada a importância de se realizar investigações para compreender melhor os mecanismos efetores da imunidade celular e humoral que são efetivamente ativados em aves vacinadas e depois desafiadas com o VBI, notadamente aqueles que se desenvolvem na traquéia, que é a porta de entrada e principal sítio primário de replicação desse vírus, a fim de que sejam melhores definidos os parâmetros mais relevantes envolvidos no desenvolvimento da imunidade de proteção nas aves vacinadas.

III. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar as respostas imunes humorais e cito-mediadas contra o VBI, induzidas pela imunização no primeiro dia de vida com vacinas vivas atenuadas e relacioná-las com o estado de proteção ao desafio com vírus homólogo seis semanas depois.

3.2 Específicos

Avaliar a resposta imune celular induzida pela vacinação por via mucosa, analisando-se a expressão de genes imune-associados como os marcadores das células T CD8+ e de sua atividade citotóxica (Granzima A), no tecido traqueal de aves vacinadas e posteriormente desafiadas com o Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas.

Avaliar a resposta imune humoral nos compartimentos sistêmico (soro sanguíneo) e local (secreção lacrimal), determinando os níveis e os perfis cinéticos dos anticorpos anti-VBI dos isótipos IgG, IgM e IgA.

Relacionar os níveis das respostas imunes celulares e humorais detectadas em aves vacinadas com as de aves não vacinadas com a intensidade dos efeitos deletérios provocados na traquéia pelo desafio com a estirpe virulenta do VBI.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estirpes do VBIG empregadas

No presente trabalho foi empregada a estirpe de referência (M-41) do VBIG que foi obtida do Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves da EMBRAPA (Concórdia-SC). Foi utilizado ainda a estirpe H-120 proveniente da vacina comercial viva atenuada do VBIG da Fort Dodge Saúde Animal (Mass I), que é originária da estirpe M-41 atenuada através de 120 passagens em ovos embrionados “Specific Pathogen Free” (SPF). O título de partida dessa vacina foi igual a 10^4 DIE₅₀ por dose conforme prescreve o fabricante.

4.2 Propagação viral em ovos embrionados SPF

Esta técnica foi realizada com base na descrição de Owen et al. (1991), com a introdução de algumas alterações. Em suma, a amostra teste de M-41 foi inoculada em ovos embrionados SPF com dez dias de idade. A amostra foi preparada e diluída na razão 1:10 em meio Eagle e foi inoculada na cavidade cório-alantóide, administrando-se um volume de 200µL/ovo. Após 24 horas da inoculação, os ovos foram avaliados, sendo que a mortalidade que ocorreu neste período foi considerada inespecífica e o ovo descartado. Entre 30-40 h pós-inoculação, os ovos foram refrigerados e o Líquido Córeo Alantóide (LCA) foi colhido individualmente, sendo distribuído em alíquotas e estocado a -70°C até ser processado nos métodos de titulação da infectividade viral.

A mortalidade do grupo controle (ovos inoculados apenas com meio Eagle) foi avaliada diariamente e, ao final de sete dias, os ovos foram resfriados e os embriões

foram avaliados quanto à presença de lesões características da infecção pelo VBIg, como “nanismo e enrolamento”.

4.3 Determinação da Dose Infectante Embrionária 50% (DIE_{50%}) da estirpe M-41 do VBIg

A infectividade viral foi determinada para a estirpe M-41 do VBIg através da titulação viral em ovos embrionados SPF com 10 dias de incubação, de acordo com método preconizado por Gelb et al. (1991). Partindo-se do LCA colhido de ovos infectados após a terceira passagem, determinou-se o número de Doses Infectantes Embrionárias 50% (DIE_{50%}) através do método de Reed e Muench (1938). Para tanto, foram inicialmente preparados diluições de razão constante igual a dez e no intervalo entre 10^{-1} a 10^{-9} das suspensões das estirpes M41 e H120 do VBIg em Meio Eagle (Gibco BRL, EUA) contendo antibióticos (200 UI/mL de Penicilina e 50 µg/mL de Estreptomicina) e antifúngico (50 UI/mL de Fungizone) e inoculadas na cavidade alantóide, no volume de 200 µL/ovo. Foram utilizados cinco ovos para cada diluição, além de dez ovos destinados ao controle (não infectados). A mortalidade foi observada durante todo o período de incubação, considerando-se morte inespecífica com 24 horas pós-incubação e, ao final de sete dias, as alterações embrionárias dos sobreviventes foram analisadas.

4.4 Infecção experimental em aves SPF

O experimento foi realizado no infectório do Laboratório de Imunologia e Virologia Animal, Departamento de Patologia Animal, da Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

4.4.1 Infecção experimental em aves SPF com a estirpe M41

Foram utilizadas 60 aves SPF (“Specific Pathogen Free”) da linhagem Leghorn, sem distinção de sexo, provenientes do Laboratório da Fort Dodge S/A. Estas aves foram divididas em três grupos e mantidas em isoladores com pressão positiva em salas climatizadas com pressão negativa. O grupo 1 foi composto por 30 aves, nas quais foram aplicadas, por via aerossol (spray), uma suspensão do veículo diluente da vacina, sem a presença de vírus, de forma a constituir o grupo controle negativo desse protocolo de imunização. Já, o grupo 2 composto por 15 aves, foi vacinado via aerossol no primeiro dia de idade com uma dose menor do que a usualmente recomendada (subdosagem muito utilizada economicamente em algumas empresas avícolas), correspondente a $10^{3,5}$ DIE₅₀. No grupo 3 também composto por 15 aves foram vacinadas no primeiro dia de idade, via aerossol, com a dosagem recomendada pelo fabricante da vacina (10^4 DIE₅₀). A utilização das diferentes dosagens além de refletir as realidades de empresas avícolas brasileiras também nos permitiu avaliar os efeitos dose-dependentes das vacinas empregadas. Aos 41 dias de idade, 15 aves do grupo 1 (aves controle) foram sacrificadas, compondo o grupo considerado controle negativo desse experimento, ou seja, aves que não foram vacinadas nem desafiadas. A vacinação foi realizada via aerossol por ser o método de eleição comercialmente utilizado nas empresas avícolas do Brasil.

O desafio foi realizado em todas as aves remanescentes aos 42 dias de vida com a estirpe M41 do VBIg. A dose utilizada para o desafio foi de 10^5 DIE₅₀ por ave, sendo todas as aves desafiadas via óculo-nasal, método que possibilita a certificação de que todas as aves receberam a mesma quantidade de suspensão antigênica M41. Foram sacrificadas cinco aves de cada grupo nos intervalos 1, 5 e 10 dpi e colhidas amostras de traquéia para análise no microscópio óptico invertido para avaliação da ciliostase. Nos mesmos períodos, as traquéias também foram colhidas para análise histológica e para processamento da PCR em tempo real (rt RT-PCR). Foram colhidos ainda amostras de sangue e secreção lacrimal nos dias 1, 4, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 43, 47 e 52 de vida das aves para mensuração dos níveis de anticorpos anti-VBIg.

4.5 Padronização do Teste de Sandwich-ELISA-Concanavalina A (S-ELISA-Con A para a Mensuração dos Isótipos IgG, IgM e IgA contra o VBI

4.5.1 Controles positivos e negativos de soro sanguíneo e da secreção lacrimal para uso no S-ELISA-Con A

As amostras de soro sanguíneo e secreção lacrimal positivas para a estirpe M-41 foram colhidas em aves provenientes de plantéis de matrizes sistematicamente vacinadas com vacinas vivas e inativadas para o VBIg (amostra H-120). Para a utilização no ELISA foi feito um “pool” de pelo menos cinco aves para cada controle isotipo específico, tanto para soro, como para secreção lacrimal.

As amostras de soro sanguíneo e secreção lacrimal utilizadas para controle negativo foram obtidas à partir de um “pool” de amostras de soro sanguíneo e secreção lacrimal de aves SPF, mantidas em isoladores do Laboratório de

Imunologia e Virologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Câmpus de Jaboticabal, Unesp.

As amostras de sangue das aves foram colhidas por punção cardíaca e o soro obtido foi mantido a -20°C . As amostras de secreção lacrimal foram colhidas através da estimulação da mucosa ocular com uma gota de glicerol em cada olho, por cerca de 15 segundos, possibilitando o lacrimejamento e a colheita com uma micropipeta e ponteira de $200\mu\text{L}$ (AITKEN et al., 1975). As avaliações do título e da especificidade do soro sanguíneo e da secreção lacrimal de referência positiva para o VBIG foram determinadas através do método Sandwich-ELISA-Concanavalina A (S-ELISA-ConA).

4.5.2 Conjugados imunoenzimáticos

Foram utilizados os conjugados imunoenzimáticos constituídos de anticorpos de cabra com a enzima peroxidase (Bethyl - Laboratories®) contra os isótipos IgG, IgA e IgM de galinha.

4.5.3 Titulação em bloco dos imunoreagentes do S-ELISA-ConA para a quantificação de anticorpos contra o VBIG em soro e secreção lacrimal

A padronização das concentrações e diluições ótimas de uso da suspensão antigênica em LCA do VBIG da estirpe M-41, bem como das amostras de soro sanguíneo e secreção lacrimal de referência para IgG, IgA e IgM, foram determinadas através do processo de titulação em bloco em microplacas de ELISA de 96 orifícios (COSTAR®), conforme recomenda Lancellotti (2002) e Bronzoni et al. (2005). A suspensão antigênica de LCA foi diluída a 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 em PBS-Tween (PBST) com 10% de leite em pó desnatado (LPD), enquanto os soros

sanguíneos de referência foram diluídos também em PBST com 10% de LPD a 1:50, 1:100 e 1:200. As concentrações de soro sanguíneo e suspensão antigênica que apresentaram maior sinal (ao redor de 1,0), representado pela densidade óptica, com menor ruído e sinal inespecífico na reação de S-ELISA-ConA foram adotadas para a posterior análise sorológica dos grupos desafiados e controle. Para a determinação da melhor concentração de secreção lacrimal das amostras de referência foram testadas diluições de 1:25, 1:50 e 1:100.

Com o estabelecimento destes parâmetros foi seguido o protocolo descrito por Bronzoni et al. (2005), no qual as microplacas foram adsorvidas com a Concanavalina-A na concentração de 0,5mg/mL preparada em tampão fosfato (PBS) (0,01M de PO₄; 0,15M de NaCl) , pH 7,4 e incubadas por 18 horas a 4°C. Posteriormente, as microplacas foram lavadas quatro vezes com PBST e bloqueadas com a adição de leite em pó desnatado (LPD), diluído a 10% em tampão carbonato bicarbonato (TCB), por 45 minutos a 37°C. Após a incubação, as microplacas foram lavadas novamente e foi adicionada 50µL da suspensão antigênica do VBIG, sendo a reação incubada por uma hora a 37°C. Em seguida, foram adicionadas as suspensões com diluições únicas, previamente determinadas como ideais, dos soros sanguíneos testes colhidos dos grupos vacinados e controles, e soros sanguíneos de referências positivo e negativo contra o VBIG, incubando-se e lavando-se as microplacas, de maneira idêntica a etapa anterior. Na fase subsequente, as microplacas receberam os conjugados imunoenzimáticos de coelho anti-IgG, ani-IgA e anti-IgM de galinha, nas diluições de 1:6250, 1:800 e 1:1000, respectivamente, com a peroxidase seguindo o procedimento de duas horas de incubação e lavagem idêntica a etapa anterior . Na última fase da reação foi adicionado o substrato peróxido de hidrogênio no volume de 20µL e 2mg do cromógeno Orto-Fenileno-Diamina (OPD) preparados em 5,5mL de tampão citrato fosfato pH 5,0, aguardando a reação enzimática desenvolver-se por 15 minutos, em temperatura ambiente. Após esse período a atividade enzimática foi bloqueada com a adição de 50µL de ácido clorídrico HCl, 2M, por cavidade. Foram registradas, em seguida, as leituras das densidades ópticas (DO) em leitor de ELISA (Bio-Rad Mod.550), no comprimento de

onda de 490nm. Os valores médios das DO da reação de cada amostra teste feitas em duplicatas, foram transformadas em relação à amostra positiva (AP), segundo a fórmula a seguir apresentada.

$A/P = \frac{Z - X}{Y - X}$, onde:

$Y - X$

Z = DO média da amostra teste (soro sanguíneo ou secreção lacrimal)

X = DO média do controle negativo (soro sanguíneo ou secreção lacrimal)

Y = DO média do controle positivo (soro sanguíneo ou secreção lacrimal).

4.6 Avaliação da ciliostase dos anéis traqueais

Nos dias 1, 5 e 10 após o desafio, foram sacrificadas cinco aves de cada grupo das quais foram colhidas amostras de traquéias, que foram posteriormente seccionadas de forma a serem obtidas amostras das porções cranial, média e caudal. Para avaliação de ciliostase traqueal foram analisados três fragmentos de aproximadamente 1,5mm, de cada porção, totalizando nove anéis por ave. Os anéis foram acondicionados em placas de Petri contendo meio de cultura Eagle com 10% de soro fetal bovino, para serem em seguida analisados no microscópio invertido, observando-se a integridade e o grau de conservação do movimento ciliar das células epiteliais da traquéia, segundo os procedimentos descritos por DARBYSHIRE e PETERS (1985).

Foi adotado o critério de classificação em escores variando de zero a quatro, de acordo com a perda de movimento ciliar e o dano no epitélio traqueal em cada um dos quatro quadrantes analisados por anel (DI FABIO et al., 2000; ANDRADE et al., 1982), conforme demonstrado no quadro 1. Anéis que apresentaram movimentação ciliar contínua e integridade do epitélio em todos os quadrantes foram classificados com escore zero, enquanto que anéis com perda total de atividade ciliar foram classificados

com escore quatro. Considerando-se que foram analisados nove anéis traqueais por ave, o escore máximo evidenciando a completa destruição do epitélio traqueal foi de 36.

Quadro 1: Parâmetros de avaliação da ciliostase de anéis traqueais para a avaliação do estado de proteção ao desafio com VBIG.

Escore	Integridade do epitélio traqueal
0	100%
1	75 a <100%
2	50 a <75%
3	25 a <50%
4	0 a <25%

4.7 Histopatologia

Fragmentos cilíndricos de 0,5 cm de comprimento das porções cranial, média e caudal da traquéia foram colhidos nos dias 1, 5 e 10 após o desafio e foram fixados em formol tamponado a 10%, pH 7,2. Após a fixação, os fragmentos foram desidratados, diafanizados para serem em seguida incluídos em parafina e obtidas secções transversais de 5 μ m de espessura e corados com Hematoxilina/Eosina (HE). Estas etapas foram conduzidas ao laboratório de microscopia do Departamento de Patologia do Departamento de Patologia Veterinária da UNESP, Câmpus de Jaboticabal. O exame histopatológico seguiu os parâmetros de avaliação estabelecidos por Andrade et al. (1982) e Yashida et al. (1985), com algumas modificações.

Foram atribuídos escores variando de zero a três, conforme a gravidade das lesões para cada uma das características das porções traqueais. Ausência de lesões foi classificada com escore zero, enquanto processos leves, moderados e intensos foram classificados com escores um, dois e três, respectivamente. Em síntese, foram

observadas características morfológicas quanto à perda de cílios e de células epiteliais, degeneração de glândulas do epitélio, presença de infiltrado inflamatório, hiperplasia epitelial e infiltrado inflamatório na adventícia (Quadro 2). Para avaliação histopatológica de cada ave, considerou-se a soma dos três anéis traqueais por ave, com o escore máximo de 54.

Quadro 02. Parâmetros de avaliação dos anéis traqueais por histopatologia e respectivos escores.

Parâmetro	Escore
Perda de cílios	0 a 3
Perda de células epiteliais	0 a 3
Degeneração de glândulas do epitélio	0 a 3
Presença de infiltrado inflamatório	0 a 3
Hiperplasia epitelial	0 a 3
Infiltrado inflamatório na adventícia	0 a 3

4.8 Extração de RNA genômico

A extração de RNA foi realizada com o uso do kit Trizol Reagent (Invitrogen), para as amostras teciduais, conforme as especificações do fabricante, com algumas modificações.

As amostras teciduais de traquéia provenientes das aves infectadas experimentalmente (aproximadamente 0,1g - 0,2g) foram maceradas juntamente com 1000µL de Trizol Reagent, utilizando-se um micropistilo em um microtubo, conforme recomenda Okino et al. (2005). A mistura foi homogeneizada por 15 segundos no vórtex e incubada por cinco minutos à temperatura ambiente. Acrescentou-se 200 µL de uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (na proporção de 24:1), realizando-se agitação por inversão. Após um período de três minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12000×g durante 15 minutos a 4°C;

aproximadamente 500µL do sobrenadante foram transferidos para outro microtubo (1,5mL). As amostras de RNA foram precipitadas em 500µL de isopropanol, seguida de incubação por dez minutos, a temperatura ambiente e centrifugação 12000×g (dez minutos a 4°C). O isopropanol foi descartado e as amostras foram lavadas em 1000µL de etanol (75%) e secas à temperatura ambiente. Em seguida, os precipitados foram ressuspensos em 15µL de água tratada com Dietil - pirocarbonate 0,1% (DEPC) para utilização na reação de transcrição reversa (RT).

4.9 “Primers”

Os pares de “primers” utilizados para a amplificação de regiões dos genes constitutivo GAPDH, da Granzima A e do VBI foram obtidos da literatura, e descritos respectivamente por Hong et al (2006), Sarson et al (2006) e Wang e Tsai (1996). Para os “primers” codificadores do marcador CD8+ da célula T foi desenhado um novo par de “primer” com base em alinhamentos realizados no programa computacional Primer3 (frodo.wi.mit.edu), uma vez que os testados primeiramente com base na descrição de Sarson et al (2006) não apresentaram resultados satisfatórios, sendo obtidas grandes quantidades de dímeros de “primers” (quadro 3).

Quadro 3: Nomenclatura, número de acesso e procedência dos “primers” utilizados neste estudo e respectivos fragmentos amplificados.

Nome	Número de Acesso	Referência	Fragmento amplificado
W+	AY851295	Wang e Tsai (1996)	216 - 228 pb
W ^{-a}			
Granzima A +	BU409623	Sarson et al. (2006)	213 pb
Granzima A -			
CD8+	Z 22726	Desenhado	218 pb
CD8 -			
GAPDH +	K01458	Hong et al. (2006)	264 pb
GAPDH -			

+ = “Forward”/ - = “Reverse”/ ^a Modificado

4.10 Tratamento com DNase

Após a extração as amostras foram tratadas com DNase utilizando o Kit da Fermentas Life Sciences conforme recomendações do fabricante.

4.11 Transcrição reversa (RT)

A reação de transcrição reversa foi feita em um Termociclador PTC – 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, U.S.A) incubando-se a 25°C durante dez minutos a seguinte solução: 5µL do RNA genômico tratado com DNase, 1µL OligodT (Invitrogen) e 3µL de água DEPC. Em seguida, acrescentou-se 4µL do tampão da RT 5x (Invitrogen), 1µL de RNAGuard (GE), 4µL de água DEPC e incubou-se a 42°C durante dois minutos; após adição de 50U da enzima SuperScript (Invitrogen), incubou-se a 42°C durante 60 minutos, e a 70°C por 15 minutos. O volume final da reação foi de 20µL, o qual foi armazenado a –20°C para uso posterior na técnica de PCR em tempo real.

4.12 Reação em cadeia da polimerase em tempo real

Após a extração do RNA feita com a utilização do kit Trizol (Gibco BRL, EUA), tratamento com DNase e o preparo de cDNA na técnica de RT com os procedimentos descritos anteriormente, o método de PCR em tempo real foi realizado, utilizando-se o marcador SYBR Green I (Invitrogen), sendo a reação conduzida em um aparelho termociclador configurado para essa metodologia (Applied Biosystems – Modelo Real time - 7500). Foi utilizado um volume de 2,0µL de cDNA proveniente da RT, ao qual

acrescentou-se 10,16µL da mistura Taq platinum – SYBR Green (Invitrogen), 10pmol de cada “primer”, completando-se com água para um volume final de 20µl. As reações foram realizadas em microtubos especiais de 0,2mL com as tampas apropriadas para leitura óptica, o que é requerido pelo sistema de detecção e mensuração fotométrica desse equipamento de PCR em tempo real (ABI PRISM - Applied Biosystems, U.S.A). As temperaturas e os passos da PCR foram determinados em função dos primers utilizados e testados em um termociclador de gradiente.

Os ciclos da reação para o “primer” referente ao gene constitutivo GAPDH foram constituídos por um primeiro ciclo de 95°C por 10 minutos, seguindo-se de mais 44 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55,5°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Enquanto que, os ciclos da reação para o “primer” CD8+ foram constituídos por um primeiro ciclo de 95°C por 10 minutos, seguindo-se de mais 44 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 56,1°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Já os ciclos da reação para o “primer” Granzima A foram constituídos por um primeiro ciclo de 95°C por 10 minutos, seguindo-se de mais 40 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 65,0°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos.

Ao final de todas as etapas de ciclos de amplificação para cada par de “primer”, foi realizada a dissociação dos produtos amplificados de DNA, entre as temperaturas de 65°C a 95°C, para que fosse determinada a T_m correspondente (“melting temperature”), e as leituras efetuadas a cada 0,1°C. Todas as amostras foram testadas, no mínimo, em duplicata.

O valor C(T) (“Threshold cycle”) foi estabelecido neste estudo como o número de ciclos necessários para que a amostra analisada atinja a fluorescência de 0,05.

Foi utilizada a fórmula descrita por Livak e Schmittgen (2001) $2^{-\Delta\Delta C_T}$ para calcular o número de vezes de alteração na expressão de cada um dos genes de imune-resposta investigados nesse estudo (CD8 e Granzima A), onde $\Delta\Delta C_T = (C_T$

gene alvo - C_T GAPDH) tempo (1, 5 ou 10 dpi) - (C_T gene alvo - C_T GAPDH) tempo zero.

4.13 Detecção Viral

A detecção viral foi realizada através da quantificação relativa do VBIg utilizando o par de “primers” (W+/W-) descrito por WANG et al. (1996) pela técnica de RT-PCR em tempo real. Os ciclos dessa reação foram constituídos por um primeiro ciclo de 95°C por 10 minutos, seguindo-se de mais 39 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 51,4°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. A detecção do VBI na técnica de RT-PCR em tempo real foi baseada nos preceitos de Escutenaire et al. (2007), sendo consideradas positivas as amostras que apresentaram aumento exponencial da curva de amplificação e também um valor específico de T_m .

4.14 Eletroforese em gel de agarose

Após as reações de PCR em tempo Real, foi realizada uma corrida eletroforética em gel de agarose para confirmar o tamanho dos fragmentos obtidos na amplificação com cada par de “primers” de maneira a comprovar sua especificidade do produto amplificado gerado. Para tanto, foram adicionados 2µL de tampão amostra [0,05% (p/v) de azul de bromofenol; 40% de sacarose (p/v); Tris-HCl 10mM e pH 7,8; EDTA 1M e pH 8,0] em 5µL de produto amplificado, o qual foi analisado através de eletroforese horizontal no sistema , em tensão de 100V por aproximadamente uma hora, em gel de agarose 1% contendo tampão TEB 0,5X (Tris 0,045M, ácido bórico 0,045M e EDTA 0,001M, pH 8,0) e brometo de etídio (0,5µg/µL). Como padrão de peso molecular foi utilizado o marcador “100bp DNA

Ladder” (Invitrogen) ou o marcador “1kb plus” (Invitrogen) para eletroforese dos produtos de PCR. Os géis foram visualizados através de incidência de luz ultravioleta em um transiluminador (Syngene) e fotodocumentados com uma câmera digital (Synoptics) e processados por meio do software Gene Link (Syngene).

4.15 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no Programa SAS (Statistical Analysis System, Institute, 1995), pelo teste de Kruskal - Wallis (análise de variância de um fator para dados não paramétricos) seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, utilizando-se nível mínimo de significância de 5% ($p < 0,05$).

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção e titulação da estirpe M-41 do VBIG

A estirpe M-41 do VBIG foi inoculada em ovos embrionados SPF com 10 dias de incubação, sendo o LCA colhido após 36 horas da inoculação. A titulação dessa estirpe foi realizada a partir da inoculação do antígeno, no volume de 200µL/ovo, em diluições na base 10 entre 10^{-3} a 10^{-8} , em ovos embrionados SPF com 10 dias de incubação (Quadro 4). Foram considerados no cálculo de Reed & Muench os embriões mortos até sete dias pós-inoculação ou que apresentaram lesões características do VBIG como enrolamento ou nanismo. O título obtido foi de $10^{-7,74}$ DIE₅₀/0,1mL ($10^{-8,74}$ DIE₅₀/mL).

Quadro 4: Resultados da inoculação da estirpe M-41 em ovos embrionados, utilizados para cálculo de Reed & Muench.

Diluições	Mortos 24 horas	Mortos/ Lesões embrionárias	Embriões vivos	Acumulado Mortos (A)	Acumulado Vivos (B)	Total (A+B)	Mortos %
10^{-3}	1	4	0	20	0	20	100
10^{-4}	1	4	0	16	0	16	100
10^{-5}	1	4	0	12	0	12	100
10^{-6}	2	3	0	8	0	8	100
10^{-7}	1	2	2	5	2	7	71,42
10^{-8}	0	3	2	3	4	7	42,85

5.2 Padronização do S-ELISA-ConA

Foi realizada a titulação em bloco para determinação das concentrações ideais do antígeno viral (estirpe M-41) com soros e lágrimas controles positivos e negativos para cada um dos isótipos de anticorpos anti-VBIG avaliados (IgG, IgA ou IgM). Foram consideradas ideais as diluições do antígeno e soros ou lágrimas de referência cuja reação imunoenzimática apresentou maior sensibilidade com menor ruído, com equivalência nas DO dos controles em relação ao antígeno. Assim sendo, a diluição ideal da suspensão antigênica viral utilizada em todas as placas de ELISA foi de 1:2, já a diluição das amostras de soro foi de 1:100 e por último, a diluição ideal das amostras de secreção lacrimal foi de 1:25.

5.3 Resposta imune humoral no soro sanguíneo e secreção lacrimal, induzida pela vacinação ou não e pelo posterior desafio com o VBIG

5.3.1 Perfil cinético dos anticorpos Anti-VBIG dos isótipos IgG, IgM e IgA no soro sanguíneo

O perfil cinético da Resposta Imune Humoral Sistêmica para IgG e IgM, obtido no soro sanguíneo, foram muito parecidos, diferindo apenas nos níveis de anticorpos. Já para os anticorpos IgA, níveis muito reduzidos ou até mesmo ausência foram encontrados ao longo desse período (Figuras 1, 2 e 3).

Ao se analisar o perfil cinético na resposta imune humoral sistêmica obtido neste estudo para IgG, nota-se que houve aumento significativo dos níveis de anticorpos, mensurados aqui como valores A/P, em relação somente ao intervalo de tempo correspondente aos 47^o e 52^o dias de idade, indicando que somente nesses

períodos, respectivamente 5 e 10 dias pós-desafio, os níveis de anticorpos elevaram-se significativamente nos grupos 2 e 3, enquanto que no grupo 1 (não vacinado) tal aumento ocorreu somente no 10º dia pós-desafio, ou seja a soroconversão foi mais tardia, provavelmente devido à falta de linfócitos B de memória conferidos aos grupos vacinados no primeiro dia de vida (Figura 1).

Foi observada ainda, uma diferença significativa das médias dos níveis de anticorpos das aves dos grupos vacinados (grupos 2 e 3) indicando que a vacina H-120 induziu uma produção mais precoce nos grupos imunizados, em relação ao grupo controle não imunizado (grupo 1) nos dias 14º, 21º, 28º, 35º, 42º, 43º, 47º e 52º, embora até o 1º dpi as magnitudes dos níveis de tais anticorpos tenham sido muito reduzidas (inferiores ao valor A/P = 0,1) (Figura 1). Com respeito à cinética das respostas imunes humorais induzidas após a vacinação contra o VBI, foi verificado que as máximas elevações dos anticorpos anti-virais específicos do isótipo IgG no soro sanguíneo de aves vacinadas geralmente ocorrem aos 21 dias após a vacinação (MOCKET e DARBYSHIRE, 1981), fato esse que não ocorreu nas aves imunizadas em nosso estudo. Mesmo assim, constata-se que os títulos de anticorpos IgG até o dia do desafio (42 dias) foram condizentes com uma única dose de vacina viva administrada no primeiro dia de idade dos pintinhos testados e apresentaram diferenças significativas com o grupo controle o qual apresentou títulos muito reduzidos.

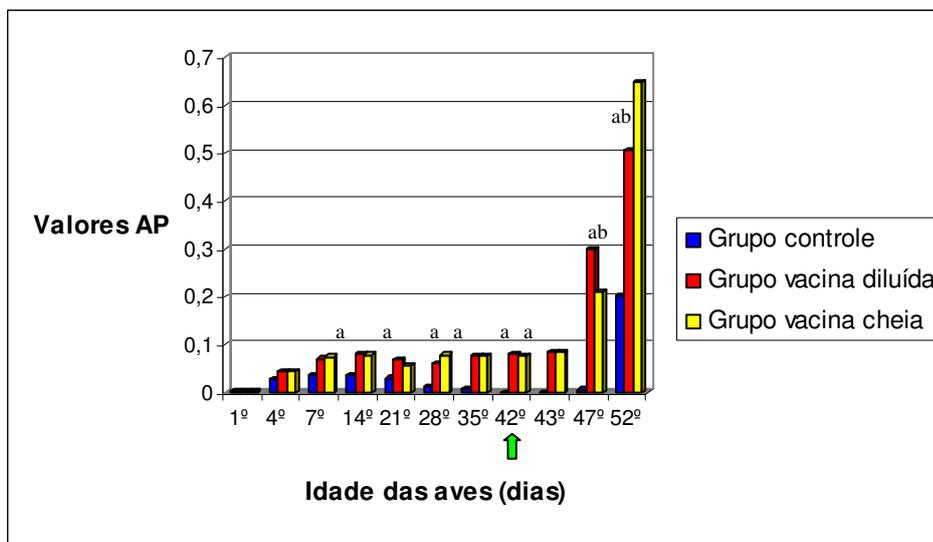


Figura 1. Perfil cinético da concentração de anticorpos do isótipo IgG anti-VBIG detectados pelo S-ELISA-ConA no soro sanguíneo de aves não imunizadas e imunizadas.(a) Diferenças significativas em função do tempo. (b) Diferenças significativas em função dos grupos. ↑ Dia do desafio. Teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

Quanto ao perfil cinético relativo aos anticorpos anti-VBIG do isótipo IgM, constata-se que houve um pequeno aumento, ainda que significativo, dos níveis desses anticorpos em relação ao tempo, mas somente nos dias 47º e 52º, que foram observados incrementos de maior intensidade nesse período que coincide com as diferenças maiores que foram encontradas entre as concentrações médias de tais anticorpos das aves dos grupos vacinados (grupos 2 e 3) em relação as do grupo controle não imunizado (Figura 2). Tais achados são similares aos relatados por MOCKETT e COOK (1986). Deve-se ainda enfatizar que esse perfil cinético de resposta para os anticorpos IgM é de certa forma um fenômeno esperado, em razão de que as imunoglobulinas do siótipo IgM são de produção mais precoce, estando via de regra presentes em maiores teores em infecções recentes. Além disso, levando-se em consideração que esses anticorpos apresentam um amplo espectro de reconhecimento de antígenos em relação aos anticorpos IgG, sendo muito úteis e efetivos na imunidade em períodos iniciais de uma infecção, atingindo um pico de

concentração em torno de oito dias, perfil cinético este que foi observado nas aves do grupo controle que apresentaram os níveis mais elevados de anticorpos anti-VBIG do isótipo IgM, ao redor do décimo dia pós desafio. Ao contrário dessa resposta, nas aves dos grupos vacinados os teores desse isótipo de anticorpos subiram antes, isto é, já no quinto dia pós desafio e permaneceram altos até o décimo dia pós desafio, indicando que células de memória do isótipo IgM provenientes da vacinação no primeiro dia permitiram uma resposta mais rápida quando comparada ao grupo controle.

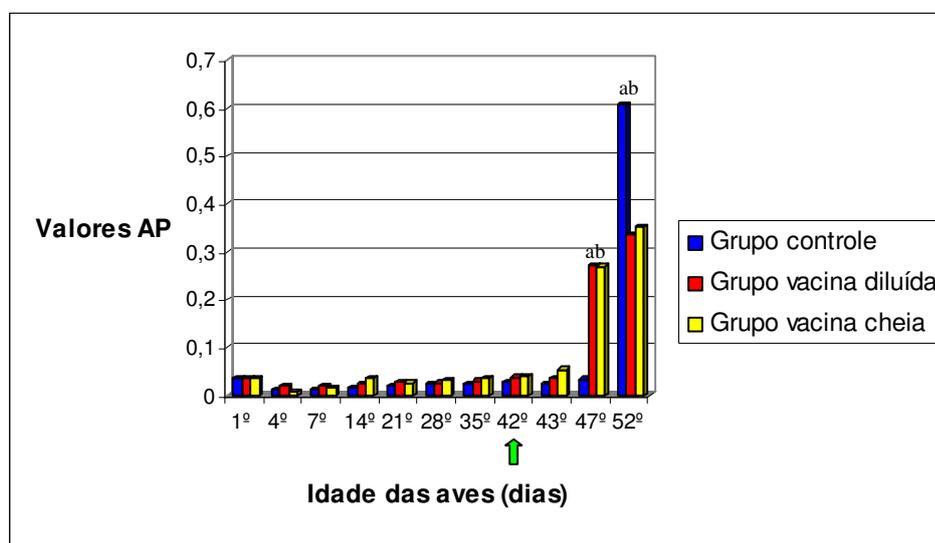


Figura 2. Perfil cinético da concentração de anticorpos do isótipo IgM anti-VBIG detectados pelo S-ELISA-ConA no soro sanguíneo de aves não imunizadas e imunizadas.(a) Diferenças significativas em função do tempo. (b) Diferenças significativas em função dos grupos. ↑ Dia do Desafio. Teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

Já o perfil cinético para os anticorpos anti-VBIG do isótipo IgA no soro sanguíneo foram observados níveis médios mais reduzidos e indistintos dos valores basais do S-ELISA-Con A, o que fica mais evidente quando se compara com os níveis de anticorpos anti-VBIG dos outros dois isótipos. Apesar disso, foram

observadas, diferenças significativas nos níveis médios desses anticorpos, nos intervalos correspondentes aos dias 14^o, 28^o, 47^o e 52^o, bem como diferenças ($P < 0.05$) entre os grupos somente no dia 47^o (Figura 3).

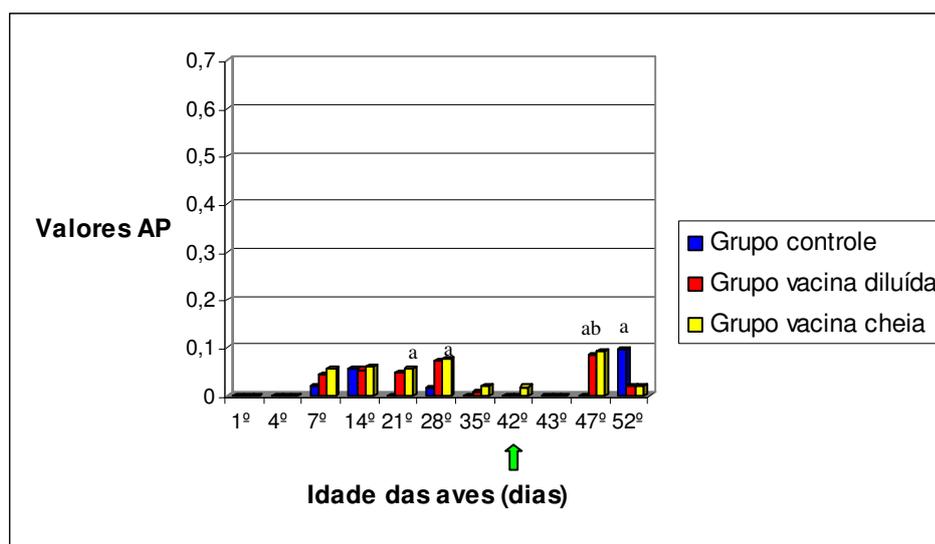


Figura 3. Perfil cinético da concentração de anticorpos do isótipo IgA anti-VBIG detectados pelo S-ELISA-ConA no soro sanguíneo de aves não imunizadas e imunizadas. (a) Diferenças significativas em função do tempo. (b) Diferenças significativas em função dos grupos. ↑ Dia do desafio. Teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

5.3.2 Perfil cinético dos anticorpos anti-VBIG dos isótipos IgG, IgM e IgA na secreção lacrimal

Diversos trabalhos relatam a fraca ou ausente correlação entre os títulos de anticorpos séricos e a proteção à infecção com o VBIG (MONDAL E NAQI, 2001; GILLETTE, 1981) enquanto que a imunidade humoral local tem revelado níveis significativos de correlação com o estado de proteção ao desafio com esse mesmo vírus (MONDAL e NAQI, 2001; TORO e FERNANDEZ, 1994). Embora os anticorpos

do isótipo IgG no soro sanguíneo revelaram uma pequena associação com a proteção ao desafio com o VBIG, os níveis de anticorpos presentes na secreção lacrimal foram de maior magnitude, para todos os isótipos (IgG, IgA e IgM). Nesse sentido, os resultados obtidos corroboraram os dados observados em investigações anteriores que também encontraram importantes marcadores de imunidade humoral na secreção lacrimal (LANCELLOTTI, 2002; PEREIRA, 2006).

Os perfis cinéticos da resposta imune humoral local (mucosas) para os anticorpos anti-VBIG dos isótipos IgG e IgM presentes na secreção lacrimal foram semelhantes. Contudo, para os anticorpos do isótipo IgA os perfis registrados foram mais reduzidos do que os desses dois primeiros isótipos de anticorpos, sendo que níveis elevados e similares aos de IgG e IgM somente foram observados para o isótipo IgA no 47º e 52º dias de idade (5 e 10 dias pós-desafio) (Figuras 4, 5 e 6).

Além disso, verifica-se que a cinética de produção de anticorpos anti-VBIG do isótipo IgG na secreção lacrimal, apresentou aumento significativo nos níveis de anticorpos de valores A/P em relação ao tempo, bem como em relação aos grupos vacinados (grupos 2 e 3) e grupo controle (grupo 1), nos dias 28º, 35º, 42º, 43º, 47º e 52º indicando que há interação significativa entre resposta imune à vacina e idade das aves, ou seja, conforme o grupo (vacinado ou não) e a idade das aves pode-se ter uma idéia dos níveis de anticorpos esperados para o isótipo IgG anti-VBIG (Figura 4). Nota-se ainda que os níveis de anticorpos dos grupos vacinados têm uma elevação mais rápida e mais intensa após o desafio, especialmente no 43º, 47º e 52º dias de idade (1, 5 e 10 dias pós-desafio) em relação ao grupo controle, cuja elevação dos níveis de anticorpos anti-VBIG é mais tardia, possivelmente devido a presença nos grupos vacinados de células B de memória para a produção desses anticorpos junto às mucosas. Constata-se que a resposta de anticorpos locais anti-VBIG do isótipo IgG local é a resposta dominante dentro da imunidade secundária contra patógenos virais, uma vez que se constitui em um dos principais mediadores dos mecanismos de defesa na mucosa contra diferentes tipos de agentes infecciosos (GUO et al., 2008).

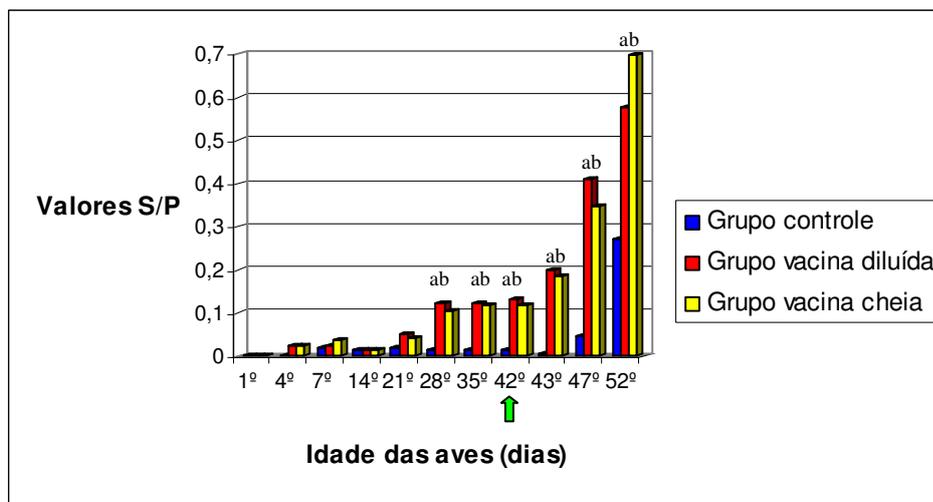


Figura 4. Perfil cinético da concentração de anticorpos do isótipo IgG anti-VBIG detectados pelo S-ELISA-ConA na secreção lacrimal de aves não imunizadas e imunizadas. (a) Diferenças significativas em função do tempo. (b) Diferenças significativas em função dos grupos. ↑ Dia do desafio. Teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

Já o perfil cinético obtido no isótipo IgM na secreção lacrimal apresentou aumento significativo das concentrações em relação ao tempo nos dias 35º, 42º, 43º, 47º e 52º, ou seja foi um pouco mais tardio do que a elevação do isótipo IgG e, ademais, alcançando níveis inferiores até o dia do desafio (42º dia). Em relação aos grupos vacinados (grupos 2 e 3) e o grupo controle (grupo 1) houve diferença significativa de valores A/P somente nos dias 43º e 47º, já que no 52º dia os níveis não diferiram estatisticamente (Figura 5).

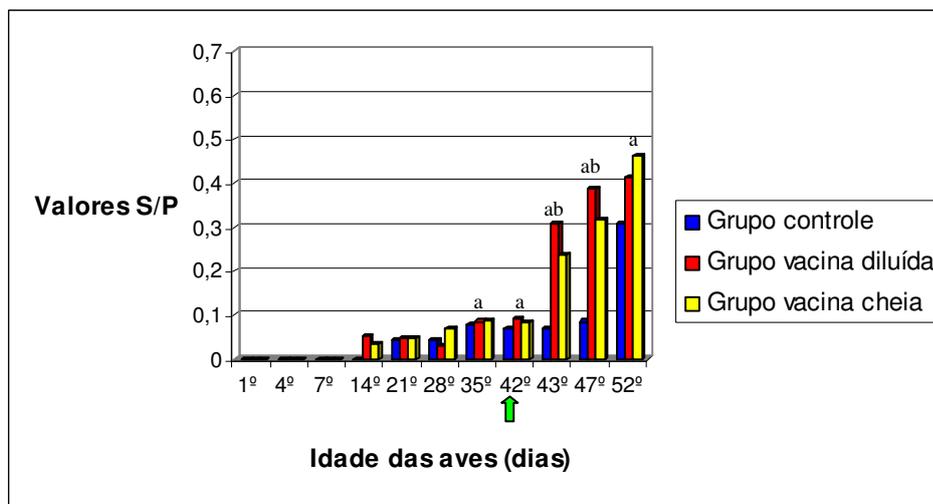


Figura 5. Perfil cinético da concentração de anticorpos do isótipo IgM anti-VBIG detectados pelo S-ELISA-ConA na secreção lacrimal de aves não imunizadas e imunizadas.(a) Diferenças significativas em função do tempo. (b) Diferenças significativas em função dos grupos. ↑Dia do desafio. Teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

No caso do isótipo IgA na secreção lacrimal, os níveis mantiveram-se baixos até o 47º dia, ocasião em que apresentou diferenças significativas de valores A/P em relação aos demais dias, mantendo-se nesse patamar até o 52º dia. Houve diferença significativa de valores A/P dos grupos vacinados em relação ao grupo controle somente no 47º dia de vida das aves, ou seja, no quinto dpi, sendo que os níveis médios dos anticorpos desse isótipo se correlacionam com a proteção ao desafio, o que corrobora com os achados de Toro e Fernandez (1994).

No 52º dia de idade das aves, ou seja, no décimo dpi, os níveis de anticorpos de todos os isótipos estudados (IgG, IgA e IgM) alcançaram os maiores valores tanto nos grupos vacinados como nos grupos controle, porém não diferiram estatisticamente (Figura 6).

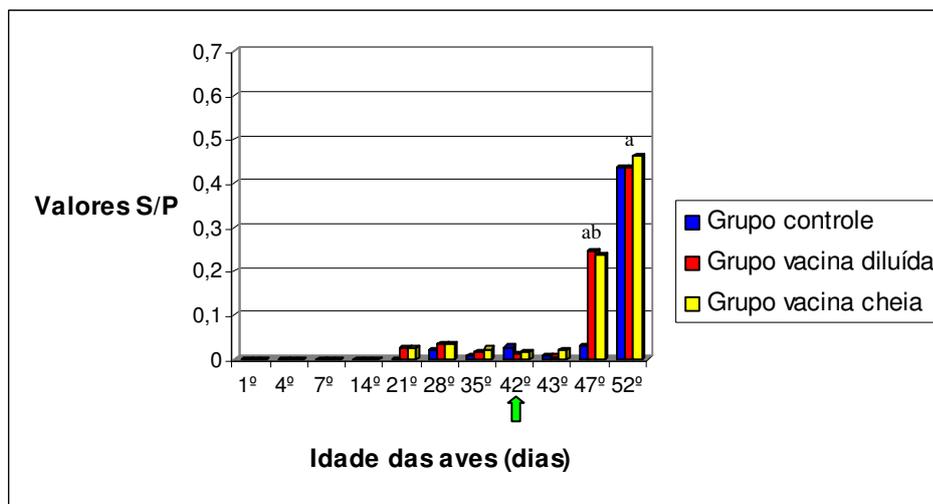


Figura 6. Perfil cinético da concentração de anticorpos do isótipo IgA anti-VBIG detectados pelo S-ELISA-ConA na secreção lacrimal de aves não imunizadas e imunizadas. (a) Diferenças significativas em função do tempo. (b) Diferenças significativas em função dos grupos. ↑ Dia do desafio. Teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

5.4. Avaliação da expressão de genes de imune-resposta cito-mediada e detecção de VBIG na traquéia de aves vacinadas ou não e desafiadas pela técnica de RT-PCR em tempo real

5.4.1. Especificidade dos “primers” usados na detecção viral ou na avaliação da expressão dos genes de imune-resposta cito-mediada na traquéia de aves vacinadas ou não desafiadas pela técnica de RT-PCR em tempo real

O tamanho específico dos fragmentos amplificados referente aos “primers” GAPDH (264 pb), CD8+ (218 pb), GRANZIMA A (213 pb) e VBIG (W+W-) (216-228 pb)

encontram-se na figura 5, comprovando que houve amplificação da região gênica específica que foi delimitada pelos diferentes pares de “primers” que foram utilizados.

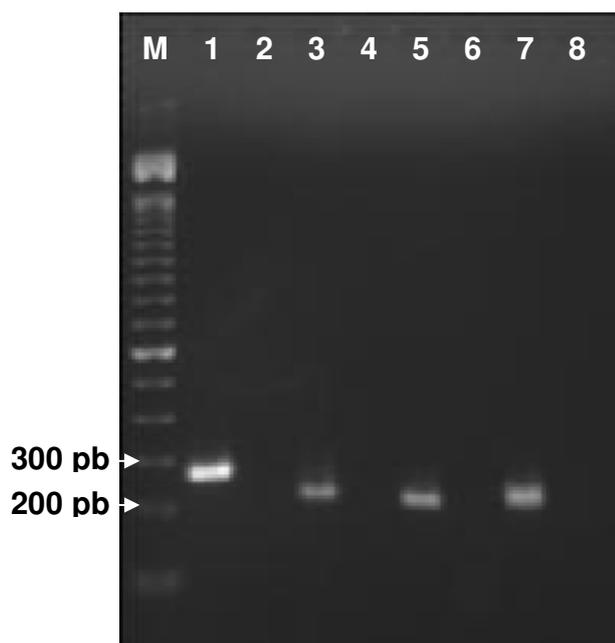


Figura 7. Confirmação dos tamanhos esperados dos “primers” analisados pela técnica de RT-PCR em tempo real. Legenda: M- Marcador 100 bp Ladder, 1-GAPDH controle positivo, 2-GAPDH controle negativo, 3-CD8+ controle positivo, 4-CD8+ controle negativo, 5-GranzimaA controle positivo, 6-GranzimaA controle negativo, 7-VBIG (W+W-) controle positivo e 8- VBIG (W+W-) controle negativo.

5.4.2 Determinação da expressão gênica do marcador CD8+ da célula T

Os resultados do PCR em tempo real para avaliação da expressão gênica do marcador CD8+ de células T citotóxicas nas amostras de traquéia das aves dos diferentes grupos experimentais apresentou variações em relação ao período pós-

desafio que foi investigado. Dessa forma, no décimo dia pós-desafio foi verificado que tais valores foram se elevaram mais acentuadamente em todos os grupos, quando comparados aos demais intervalos pós-desafio (Figura 8). Estudos prévios demonstram que células efetoras T colhidas com 10 dias pós-infecção garantem a proteção das aves da infecção aguda do VBIg e que a ativação dessas células T declina após 10 dias de infecção (COLLISSON et. al, 2003).

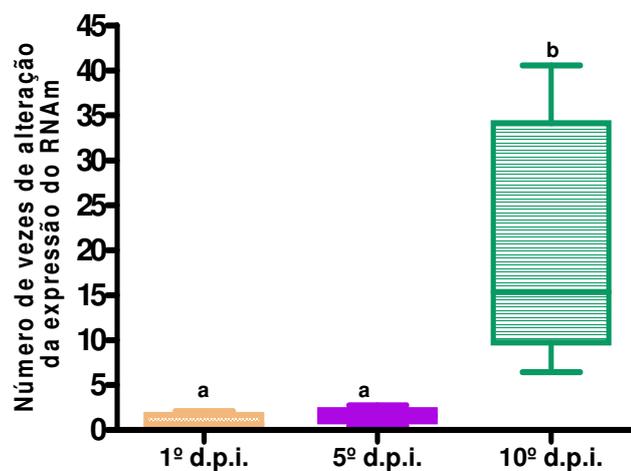


Figura 8. Comparação entre os resultados da expressão gênica do marcador CD8+ da célula T nos três grupos analisados em função dos tempos pós-desafio. Estão indicados na figura mediana e erro padrão da média. (a,b) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

Ainda, os resultados indicam que a expressão gênica do marcador CD8+ das células T citotóxicas no 1º dia pós-desafio foi mais intensa no grupo 3 (imunizado com vacina dose-cheia), o qual apresentou diferenças significativas ($P < 0,05$) quando comparado com o grupos 1 (controle). Já a expressão gênica do marcador CD8+ das células T citotóxicas observada para o grupo 2 (vacina com dose-diluída) não apresentou, nesse mesmo intervalo pós-desafio, diferenças significativas em relação aos grupos 1 e 3 (Figura 9). Resultados semelhantes foram descritos por Wang et. al

(2008) no que se refere a grupos re-infectados no qual ele encontra o mesmo valor encontrado no grupo vacina cheia no primeiro dia pós-desafio, relacionando tal fato a uma resposta imune adaptativa de memória nestes grupos previamente vacinados.

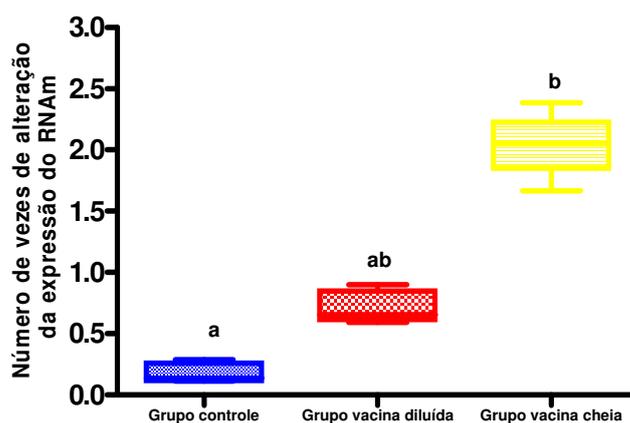


Figura 9. Comparação entre os resultados da expressão gênica do marcador CD8+ da célula T no primeiro dia pós-desafio em aves não imunizadas e imunizadas. Estão indicados na figura mediana e erro padrão da média. (a,b) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

No quinto dia pós-desafio foram registradas diferenças ($P < 0,05$) entre o nível médio de expressão das aves do grupo não vacinado (grupo 1) em relação às dos grupos vacinados (grupos 2 e 3), sendo que a expressão gênica do marcador CD8+ de células Tcitotóxicas foi mais intensa nos grupos vacinados (Figura 10).

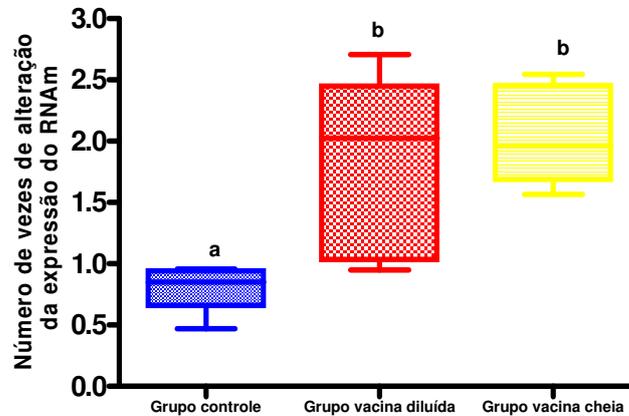


Figura 10. Comparação entre os resultados da expressão gênica do marcador CD8+ da célula T no quinto dia pós-desafio em aves não imunizadas e imunizadas. Estão indicados na figura mediana e erro padrão da média. (a,b) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

Para o décimo dia pós-desafio, foi encontrada uma total inversão na intensidade da expressão gênica do marcador CD8+ das células T citotóxicas, uma vez que foi o grupo 1 (grupo controle) no qual observou-se as maiores intensidades de expressão desse gene de imune-resposta, embora os grupos vacinados apresentassem no 10º dia pós-desafio uma expressão gênica desse marcador também elevada, quando comparados aos intervalos do 1º e 5º, seus valores médios foram significativamente inferiores ($P < 0.05$) ao das aves não vacinadas do grupo controle (Figura 11). A ativação de células T por antígenos específicos se desenvolve até 10 dias pós-infecção, período no qual são encontrados concentrações máximas destas células (SEO e COLLISSON, 1997). Durante este período, a infecção aguda foi resolvida e os antígenos virais foram detectados e eliminados, após o "clearance" do patógeno, a maioria das células T específicas sofreram apoptose (SEO e COLLISSON, 1997). Ao contrário dos grupos vacinados, as aves do grupo controle apresentaram, níveis de expressão bem mais elevados no décimo dia pós-desafio, provavelmente por não possuírem linfócitos T de memória, fato este que fez com que demorasse um pouco mais a proliferação e a

ativação de tais tipos de células efectoras que atingiram o pico apenas 10 dias pós-desafio, resultando na eliminação mais tardia do VBIg neste grupo.

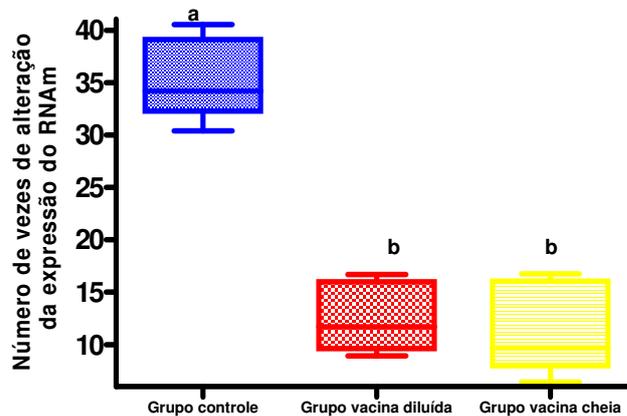


Figura 11. Comparação entre os resultados da expressão gênica do marcador CD8+ da célula T no décimo dia pós-desafio em aves não imunizadas e imunizadas. Estão indicados na figura mediana e erro padrão da média. (a,b) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

5.4.3 Determinação da expressão gênica da Granzima A

Os resultados relativos à expressão gênica do outro marcador de linfócito T citotóxico, a Granzima A, revelaram variações significativas em relação aos intervalos de tempo pós-desafio, sendo que, houve uma elevação da expressão desse gene do 1º ao 10º dia pós-desafio em todos os grupos avaliados, tal como foi observado para o gene do marcador TCD8+ (Figura 12). Achados semelhantes do perfil da expressão gênica do marcador Granzima A foram descritos em estudos sobre infecção experimental de aves com o Vírus da Doença de Marek no tocante ao tempo pós infecção, tendo sido relatado um aumento gradativo na expressão deste gene nos períodos de 4, 7 e 14 dias pós-infecção, declinando em seguida, isto é, no período de 21 dpi (SARSON et. al, 2006). No curso de infecções virais a Granzima A

de modo geral podem ser produzidas e liberadas por células NK e linfócitos T citotóxicos, atuando em mecanismos efetores destinados à eliminação das células alvo infectadas pelos vírus. Deve-se destacar que as células NK atuam em uma fase mais precoce pós-infecção, reconhecendo as células alvo por meio de outros marcadores não antígeno-específicos e nem associados com as moléculas do MHC de classe I, para posterior lise e clivagem das proteínas nucleares, eliminando assim tais células infectadas, ao passo que as células T citotóxicas, inclusive as de memória, participam de respostas imunes anti-virais um pouco mais tardias e somente após interagirem com peptídeos antigênicos associados ao MHC-I na superfície de células alvo (SARSON et. al, 2006).

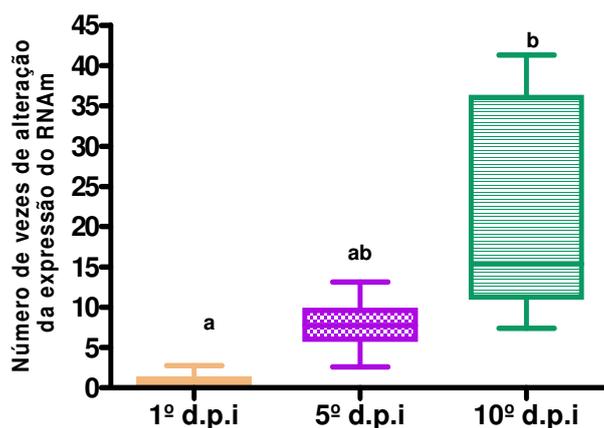


Figura 12. Comparação entre os resultados da expressão gênica da Granzima A nos três grupos analisados em função dos tempos pós-desafio. Estão indicados na figura mediana e erro padrão da média. (a,b) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

Um aspecto interessante na avaliação da expressão desses genes de imuneresposta foi a coincidência das elevações para a expressão dos genes CD8 das células T citotóxicas e da Granzima A, reforçando a participação da células T de memória nesse fenômeno. Verifica-se dessa forma que a expressão gênica da Granzima A no 1º

dia pós-desafio foi mais intensa no grupo 3 (imunizado com vacina dose-cheia), a qual apresentou diferenças significativas quando comparado com o grupo 1 (controle). Já a expressão gênica da Granzima A observada nas aves do grupo 2 (imunizado com vacina dose-diluída) não apresentou diferenças significativas em relação aos grupos 1 e 3 (Figura 13). Há uma forte evidência da importância da presença de linfócitos T de memória, a qual pode ser avaliada por meio da expressão gênica de alguns de seus marcadores como o Granzima A, que são ativados precocemente nos grupos vacinados (grupos 2 e 3) que asseguram um combate mais rápido ao VBIG em relação ao grupo controle.

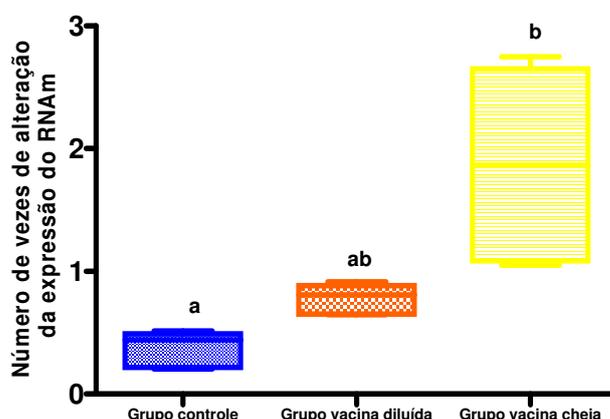


Figura 13. Comparação entre os resultados expressão gênica da Granzima A no primeiro dia pós-desafio em aves não imunizadas e imunizadas. Estão indicados na figura mediana e erro padrão da média. (a,b) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

No quinto dia pós-desafio houve aumento da expressão gênica da Granzima A em relação aos valores médios observados em todos os grupos no primeiro dia pós-desafio. Porém, não houve diferenças significativas entre o grupo não vacinado (grupo 1) em relação aos grupos vacinados (grupos 2 e 3) (Figura 14). Como os linfócitos T têm um papel fundamental na eliminação mais precoce do VBIG (WANG et al., 2006), seus marcadores de ativação como é o caso da Granzima A confirmaram esta

premissa, pois se apresentaram em níveis bem mais elevados, desde o quinto dpi, que culminaram na eliminação mais rápida deste agente infeccioso dos tecidos da traquéia das aves vacinadas e submetidas ao desafio experimental.

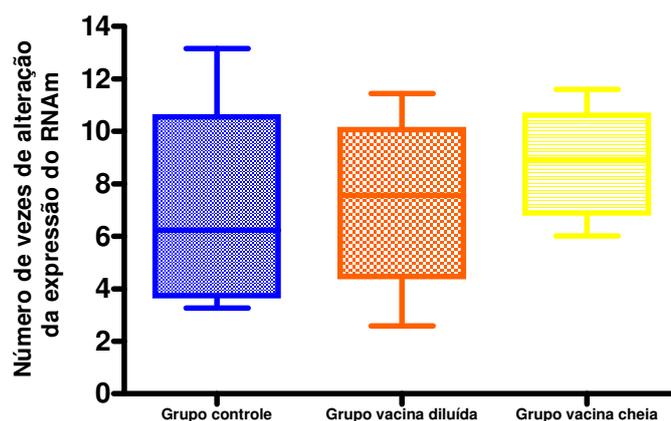


Figura 14. Comparação entre os resultados expressão gênica da Granzima A no quinto dia pós-desafio em aves não imunizadas e imunizadas. Estão indicados na figura mediana e erro padrão da média. Não houve diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

No décimo dia pós-desafio, similarmente aos achados com a expressão do gene marcador para o CD8+ das células Tcitotóxicas, houve uma total inversão na intensidade da expressão gênica da Granzima A em relação aos grupos vacinados, uma vez que foram nas aves do grupo 1 (grupo controle) em que se observaram as maiores intensidades de expressão gênica. Embora, deva ser destacado que as aves dos grupos vacinados também apresentaram 10⁹ dia pós-desafio uma expressão gênica elevada, quando comparada aos intervalos de 1 e 5 dias pós-desafio, mas os valores médios de expressão foram significativamente inferiores ao observado nas aves do grupo controle (Figura 15).

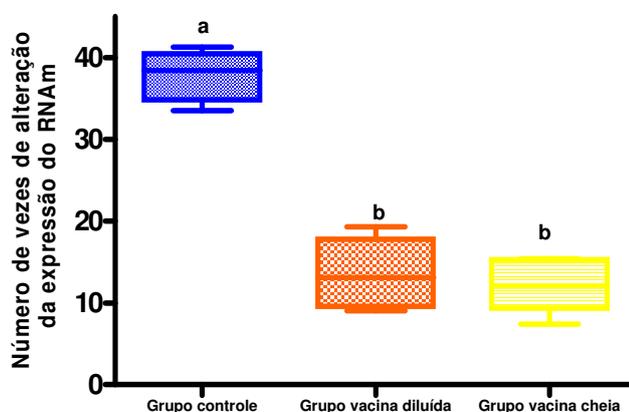


Figura 15. Comparação entre os resultados expressão gênica da Granzima A no décimo dia pós-desafio em aves não imunizadas e imunizadas. Estão indicados na figura mediana e erro padrão da média. (a,b) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

5.4.4 Detecção viral na traquéia de aves desafiadas

A combinação de “primers” W+/W- possibilitou que na técnica de RT-PCR em tempo real, fosse feita a amplificação específica da região do gene S1 alvo flanqueada por esse par de “primers”, para amostras de traquéia que contivessem quantidades detectáveis da estirpe virulenta do VBIG administrada no desafio. Após a amplificação específica das amostras positivas para o VBIG utilizando o par de “primers” W+/W- na PCR em tempo real, as amostras foram classificadas em positivas (escore um) ou negativas (escore zero).

No primeiro dpi, não foi detectada a presença de VBIG, pois os escores observados foram iguais a zero em todas as aves dos 3 grupos experimentais. Tal fato deve-se ao período de replicação do VBIG ocorrer próximo de 36 horas após

infecção (CAVANAGH, 2007), resultando na não detecção deste agente no primeiro dpi.

No quinto dia pós-desafio, encontrou-se vírus (escore 1) em todas as aves do grupo controle, fato que correlacionado aos achados de expressão mais reduzida dos genes marcadores da ativação de células T efectoras neste período, explica a presença do VBI em todas as aves deste grupo. Já, nas aves imunizadas com vacina em dose-diluída, apenas duas de cinco aves testadas, revelaram a presença de VBI nas amostras de suas traquéias. E, por fim, nas aves do grupo 3, que receberam a vacina em dose-cheia, encontrou-se apenas uma das cinco aves ensaiadas positiva para o VBI em amostras de traquéia. A análise estatística desse parâmetro revelou que houve diferenças significativas entre os grupos 1 e 3 no quinto dia pós-desafio em relação a detecção viral, porém o grupo 2, embora apresentasse apenas duas de cinco aves positivas (escore um), não apresentou diferenças significativas em relação aos outros dois grupos (Figura 16). A presença precoce das células T CD8⁺ e Granzima A nos grupos vacinados no quinto dpi sugere que tais marcadores de linfócitos T de memória são responsáveis pela eliminação parcial do VBI nestas aves, sendo que o grupo que sofreu estímulo antigênico maior durante vacinação (grupo 3) responde mais rapidamente e com maior eficiência contra o VBI quando comparado aos demais.

Já no décimo dia pós-desafio, não foi encontrado vírus nas amostras de traquéia das aves dos dois grupos vacinados, pois os escores foram iguais a zero, enquanto que nas aves do grupo não vacinado (grupo 1) foi detectada ainda em uma de cinco aves testadas a presença do VBI, porém não foram registradas diferenças significativas entre os três grupos de aves investigados. Além disso, não foi detectado o VBI na traquéia de aves vacinadas (grupos 2 e 3) neste período, pois tais aves já apresentaram no quinto dpi respostas consideráveis tanto de linfócitos T (marcadores CD8⁺ e Granzima A) como linfócitos B séricos (IgG e IgM) e na secreção lacrimal (IgG, IgM e IgA) que culminaram na eliminação do VBI até o décimo dpi. Foi observado em uma pesquisa anterior que os títulos infectantes do VBI diminuem consideravelmente em pulmões e baço de aves infectadas pelo VBI

a partir do décimo dia pós-desafio em diante, fenômeno este que é acompanhado pelos níveis de da atividade de linfócitos T, que atinge o seu máximo nesse mesmo intervalo pós-infecção e depois declina (SEO e COLLISSON, 1997).

Os resultados da detecção do VBIG na traquéia das aves também concordam com os resultados obtidos pelas técnicas da ciliostase e histopatologia, consolidando sobremaneira o estado de imunidade das aves vacinadas e posteriormente desafiadas com a estirpe M-41 em relação ao grupo controle, demonstrando que a vacina aplicada em dose cheia (grupo 3) foi eficaz na proteção ao desafio segundo padrões exigidos pela OIE.

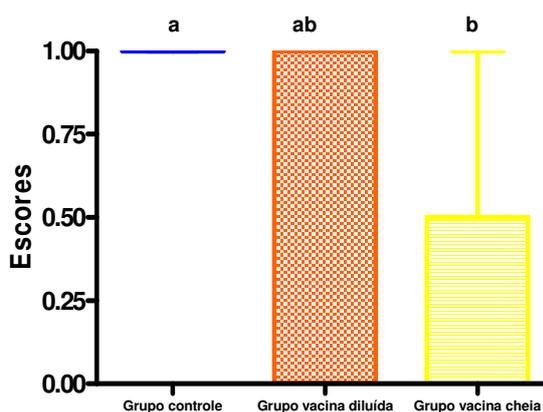


Figura 16. Comparação entre os resultados da detecção do VBIG no quinto dia pós-desafio em aves não imunizadas e imunizadas. Estão indicados na figura mediana e erro padrão da média. (a,b) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

5.5 Avaliação da proteção vacinal

5.5.1 Observações clínicas

Embora a avaliação clínica seja de caráter mais subjetivo se comparada às outras técnicas de avaliação de estado de proteção realizada neste trabalho, as aves também foram observadas quanto à sintomatologia clínica ao longo dos dez dias pós-desafio.

As aves do grupo controle (grupo 1), apresentaram sintomatologia respiratória moderada, caracterizada principalmente por estertores traqueo-bronquiolares e descarga nasal no quinto dia pós-desafio, fato que demonstra que neste período a replicação viral da estirpe M-41 está elevada o bastante para causar sintomatologia clínica da BIG em aves não vacinadas e que essa estirpe tem tropismo pela traquéia. As aves dos grupos vacinados (grupo 2 e 3) não apresentaram sintomatologia clínica da BIG uma vez que a vacina administrada no primeiro dia de idade das aves protegeu tais aves desta enfermidade.

O fato de as aves utilizadas neste experimento serem SPF pode resultar em uma sintomatologia branda e a avaliação mais objetiva do estado de proteção depende das técnicas de ciliostase e histopatologia traqueal, pois a microbiota dessas aves é relativamente pobre, comparada com aves de criações comerciais.

5.5.2 Análise da ciliostase traqueal

A análise da ciliostase traqueal possibilitou a avaliação do efeito do VBIG sobre o movimento ciliar do epitélio traqueal e na gênese de lesões traqueais, bem como avaliou a proteção da traquéia de aves vacinadas e não vacinadas frente ao desafio com a estirpe M-41 do VBIG.

Os resultados da ciliostase traqueal indicaram que o maior dano causado pelo VBIG ocorreu em aves do grupo controle não vacinado no quinto dia pós-desafio, ocasião em que foram observados os maiores escores de ciliostase. No primeiro dia pós-desafio não foram observadas atividades de ciliostase significantes pois não houve tempo hábil para replicação total do VBIG na traquéia e portanto não foi encontrada atividade ciliostática (escores zero). Com relação ao décimo dia a atividade ciliostática foi inferior quando comparada ao quinto dia, em razão de as aves, mesmo as pertencentes ao grupo controle, já terem desenvolvido respostas imunes humorais (elevada produção de IgG, IgM e IgA) e celulares (altas concentrações do marcadores de linfócitos T CD8+ e Granzima A) que evitaram, nessa ocasião, danos maiores na traquéia destas aves e possibilitaram até uma certa regeneração tecidual nestas aves, uma vez que escores de ciliostase foram inferiores quando comparados com os escores do quinto dpi (Figura 17).

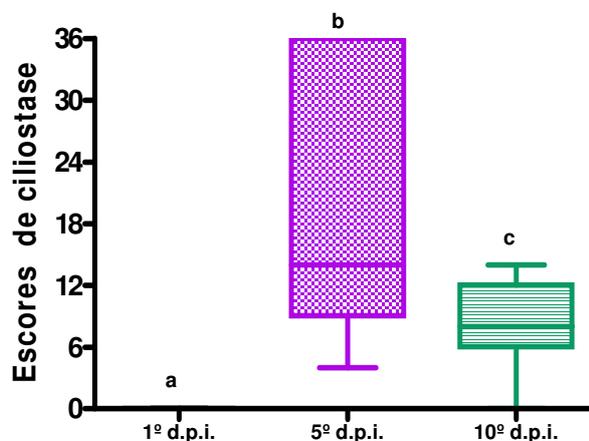


Figura 17. Comparação entre os resultados de escores de ciliostase nos três grupos analisados em função dos tempos pós- desafio. Estão indicados na figura mediana e erro padrão da média. (a,b,c) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

No quinto dia pós-desafio, os resultados indicaram que as aves vacinadas do grupo 3 apresentaram um elevado grau de proteção, com escores menores e diferentes ($p < 0,05$) do grupo controle, uma vez que a menor média de escores obtidos na ciliostase foi deste grupo. Já as aves imunizada com sub-dosagem vacinal (grupo 2) também apresentaram um elevado grau de proteção conquanto a esse parâmetro em relação às aves controle não vacinadas (grupo 1), porém não apresentaram diferenças ($p < 0,05$) entre as aves que receberam dose vacinal completa e as do grupo controle. Os escores de ciliostase do grupo 2 não diferiram daqueles observados para o grupo 3. Por fim, as aves do grupo 1 (grupo controle) apresentaram completa ciliostase (escore 36) com presença de extensas lesões no epitélio traqueal, conforme demonstrado na figura 18.

Embora a ciliostase esteja sendo quantificada em escores, Darbyshire (1980) aferiu que a proteção ao desafio estava associada à habilidade de uma estirpe vacinal de VBIG em conferir resistência na traquéia frente ao desafio com outra

estirpe, observada pela incapacidade de induzir completa ciliostase no epitélio traqueal. Alguns experimentos realizados com a estirpe homóloga do VBIG, como é o caso da M-41 utilizada neste experimento, indicam resultados de proteção nos grupos vacinados de 100% das aves, pelo método de avaliação da estase ciliar (CAVANAGH, 2003; DI FABIO et al., 2000). Como apenas uma ave de cada grupo dos grupos vacinados 2 e 3 apresentaram perda da integridade do movimento ciliar comparável ao grupo não vacinado no qual 100% das aves apresentaram escores máximos na ciliostase, pode-se presumir que um número reduzido de aves é mais interferente nos resultados, uma vez que variações individuais na susceptibilidade a lesões no epitélio traqueal, bem como divergências da resposta imune frente à vacinação tipo spray e ou ao desafio destas aves são fatores que interferem neste tipo de análise comprometendo sobremaneira resultados de proteção vacinal. Tal fato, torna-se mais evidente ao se considerar que neste período essas mesmas aves de cada grupo vacinado apresentaram na histopatologia perda total da integridade epitelial na traquéia além da detecção do VBIG neste órgão (dados não apresentados), eliminando a hipótese de falha ou subjetividade na técnica de ciliostase e fortalecendo sobremaneira a hipótese de que tais aves de alguma maneira não responderam adequadamente à vacinação.

Apesar dessa variação individual ocorrida no grupo de aves vacinadas, os resultados da ciliostase no grupo vacinado com a dose-cheia (grupo 3) foram significativamente divergentes em relação ao grupo de aves não vacinadas, que apresentaram ciliostase de escore máximo em todas as aves, demonstrando que tal grupo vacinado apresentou uma efetiva proteção ao desafio com a estirpe M-41 no quinto dpi e que a vacina comercial H-120 foi eficaz.

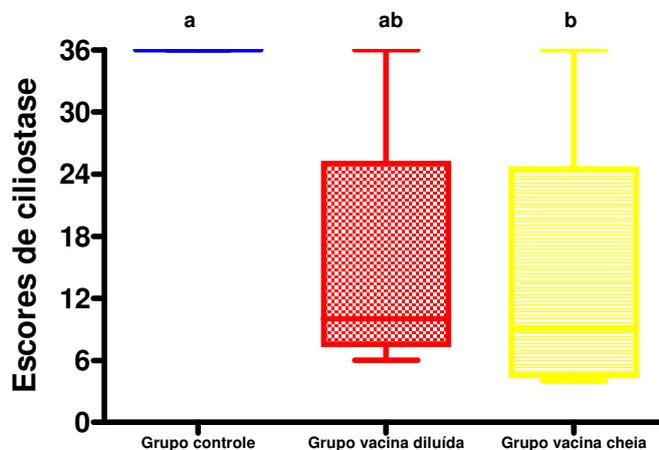


Figura 18. Comparação entre os resultados de escores de ciliostase no quinto dia pós-desafio em aves não imunizadas e imunizadas. Estão indicados na figura mediana e erro padrão da média. (a,b) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

Já no décimo dia pós-desafio, além dos escores de ciliostase já estarem inferiores em relação aos escores encontrados no quinto dia pós-desafio, não houve diferenças significativas entre os grupos vacinados e não vacinados (Figura 19). Tais achados corroboram com os resultados encontrados na histopatologia e na detecção do VBig na traquéia destas aves, sugerindo que, em conjunto com os dados obtidos das respostas imunes humorais e celulares, as aves mesmo do grupo controle já tem uma resposta imunológica atuante e que parece ser capaz de conferir proteção mais tardia nas aves não vacinadas contra o VBig.

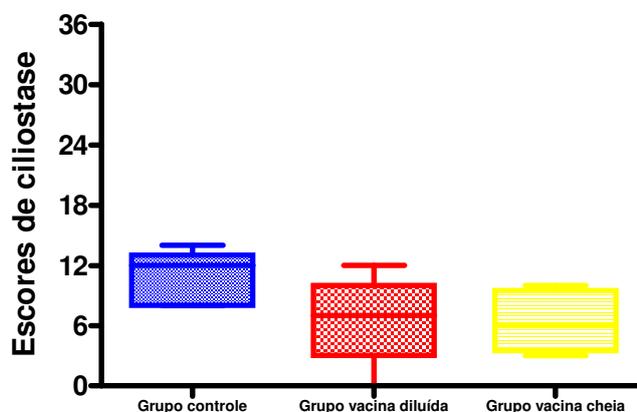


Figura 19. Comparação entre os resultados de escores de ciliostase no décimo dia pós-desafio. Estão indicados na figura mediana e erro padrão da média. Não houve diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

A avaliação do movimento ciliar conforme as diferentes porções cranial, média e caudal da traquéia de aves vacinadas e não vacinadas indicou que não há diferença na susceptibilidade para os efeitos deletérios da infecção pelo VBIG nas diferentes porções traqueais (dados não apresentados).

5.5.3 Histopatologia

Os resultados da histopatologia de traquéia corroboraram quase que totalmente com aqueles obtidos na avaliação da ciliostase, uma vez que os maiores escores de lesões histopatológicas foram alcançados no quinto dia pós-desafio, enquanto que no primeiro dia pós-desafio os escores foram praticamente iguais a zero e no décimo dia os escores apresentaram-se muito reduzidos quando comparados aos escores do quinto dia (Figura 20).

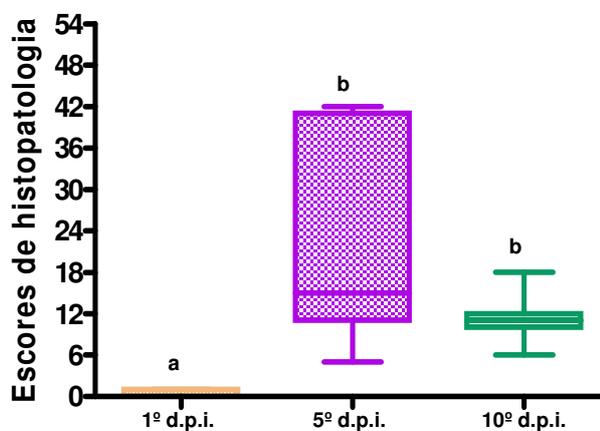


Figura 20. Comparação entre os resultados de escores da histopatologia nos três grupos analisados em função dos tempos pós-desafio. Estão indicados na figura mediana e erro padrão da média. (a,b) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

Os resultados indicaram ainda menores escores de histopatologia em aves submetidas ao desafio com a estirpe M-41 nos grupos de aves vacinadas, com diferença significativa em relação ao grupo de aves não vacinadas no quinto dia pós-desafio. Embora ocorresse pequena variação individual em relação às lesões microscópicas induzidas pelo VBIG, todas as aves do grupo não vacinado apresentaram intensa perda ciliar, inflamação e degeneração de glândulas epiteliais, moderada perda de células epiteliais e hiperplasia, além de leve inflamação na adventícia. Os resultados estão demonstrados nas figuras 21, 22, 23, 24, 25, 26 e 27.

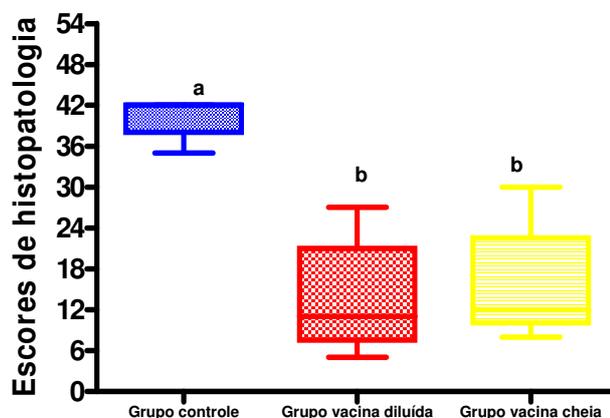


Figura 21. Comparação entre os resultados de escores da histopatologia no quinto dia pós-desafio em aves não imunizadas e imunizadas. Estão indicados na figura mediana e erro padrão da média. (a,b) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

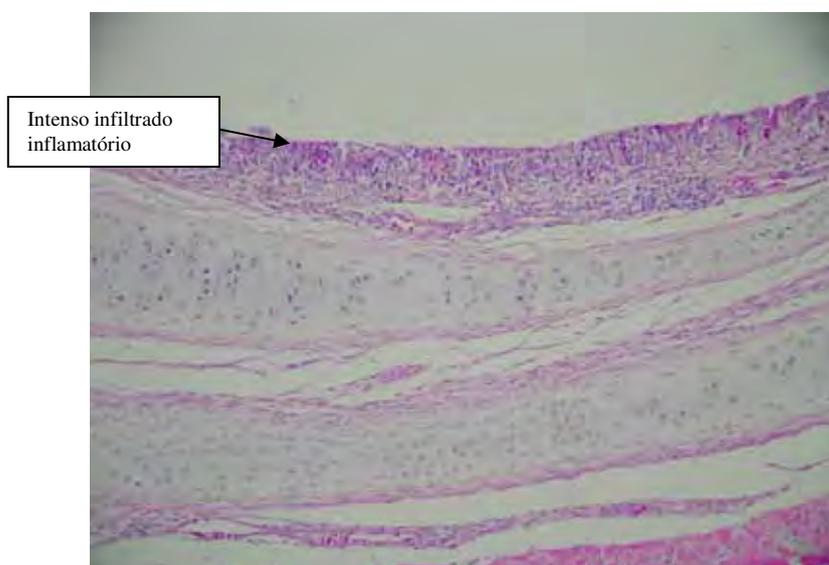


Figura 22. Fotomicrografia de histopatologia com coloração hematoxilina-eosina, em aumento de 40x, de traquéia de ave do grupo 1 (não vacinado) no quinto dia pós-desafio, demonstrando intenso infiltrado inflamatório, perda ciliar e degeneração de glândulas epiteliais, além de moderada hiperplasia.

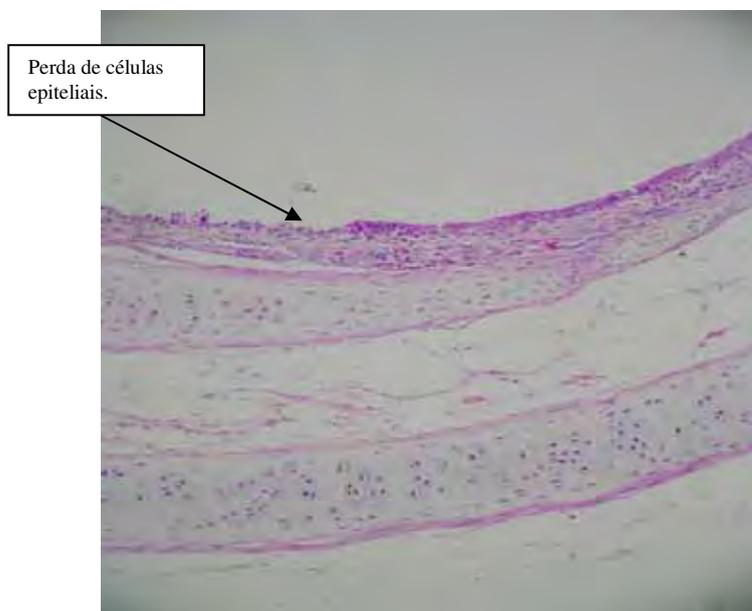


Figura 23. Fotomicrografia de histopatologia com coloração hematoxilina-eosina, em aumento de 40x, de traquéia de ave do grupo 1 (não vacinado) no quinto dia pós-desafio, demonstrando moderada perda de células epiteliais, intensa perda ciliar e degeneração de glândulas epiteliais.

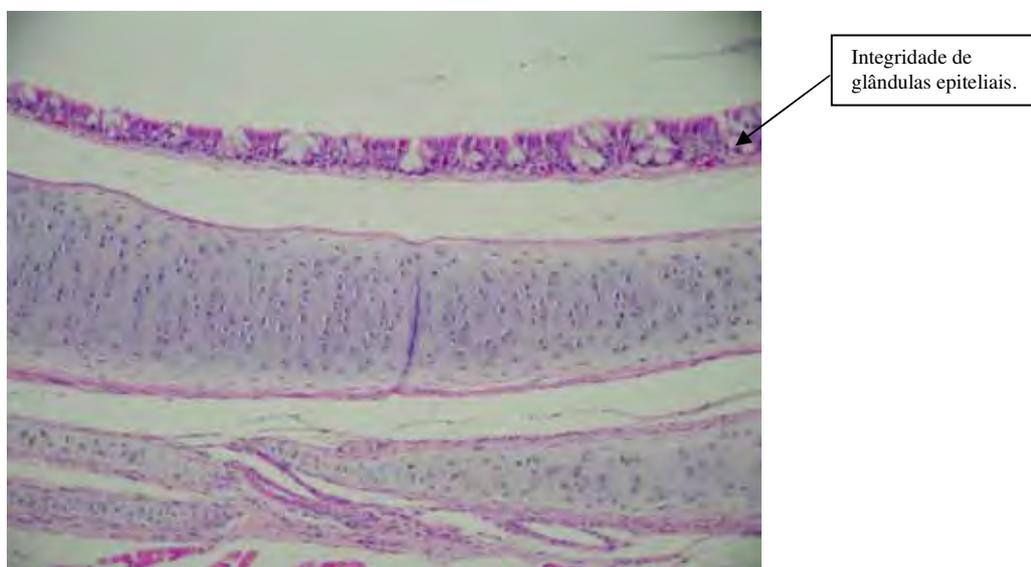


Figura 24. Fotomicrografia de histopatologia com coloração hematoxilina-eosina, em aumento de 40x, de traquéia de ave do grupo 2 (vacina dose-diluída) no quinto dia pós-desafio, demonstrando leve perda de cílios, com preservação de células e glândulas epiteliais, além de infiltrado inflamatório leve.

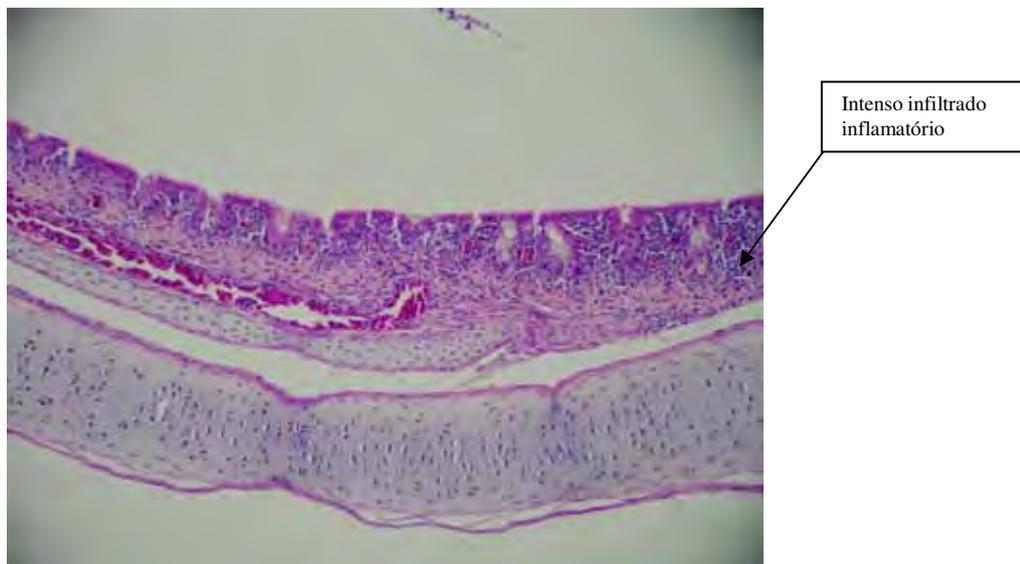


Figura 25. Fotomicrografia de histopatologia com coloração hematoxilina-eosina, em aumento de 40x, de traquéia de ave do grupo 2 (vacina dose-diluída) no quinto dia pós-desafio, demonstrando infiltrado inflamatório moderado, leve perda ciliar e preservação de células e glândulas epiteliais.

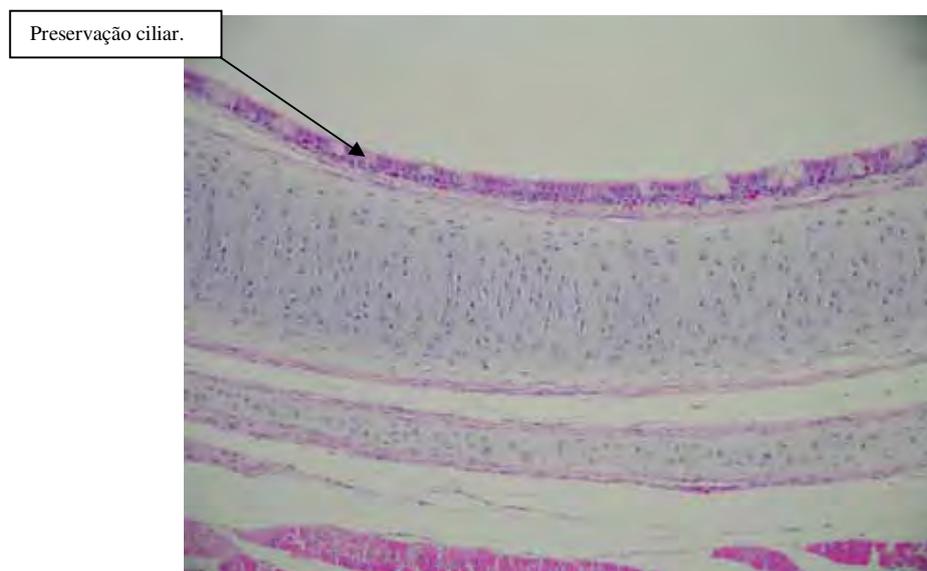


Figura 26. Fotomicrografia de histopatologia com coloração hematoxilina-eosina, em aumento de 40x, de traquéia de ave do grupo 3 (vacina dose-cheia) no quinto dia pós-desafio, demonstrando infiltrado inflamatório leve, leve perda ciliar além de preservação de células e glândulas epiteliais.

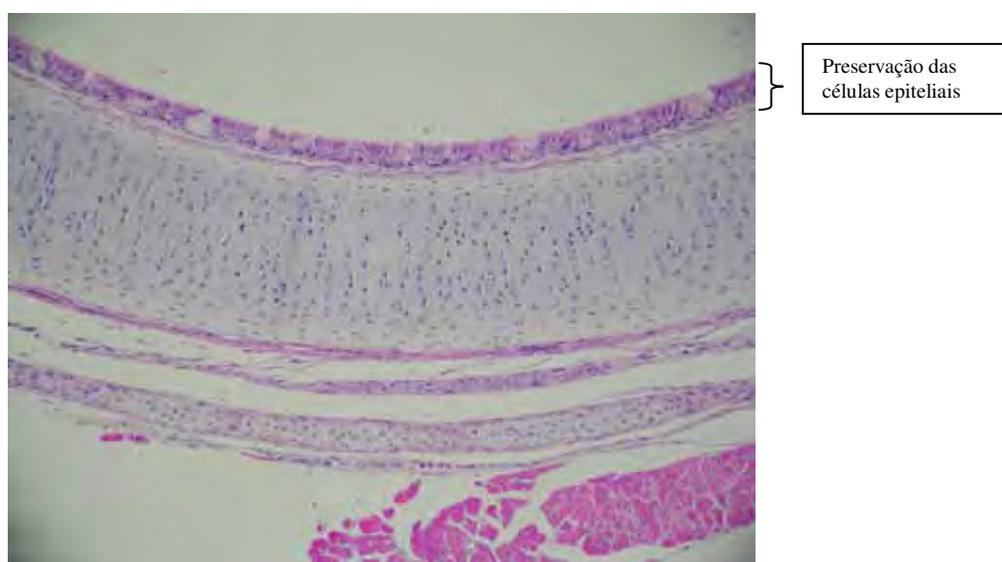


Figura 27. Fotomicrografia de histopatologia com coloração hematoxilina-eosina, em aumento de 40x, de traquéia de ave do grupo 3 (vacina dose-cheia) no quinto dia pós-desafio, demonstrando infiltrado inflamatório leve, leve perda ciliar e degeneração de glândulas epiteliais, com preservação de células epiteliais.

Já no décimo dia pós-desafio foi verificado um quadro histopatológico compatível com estado apropriado de proteção ao desafio ($p < 0.05$) principalmente no grupo 3 em relação ao grupo 1, enquanto o grupo 2 não demonstrou diferenças ($p < 0.05$) em relação aos demais grupos (Figura 28). Tais resultados reforçam aqueles que foram observados na análise de ciliostase traqueal, porém o exame histopatológico apresenta uma especificidade maior já que são avaliados vários parâmetros além da perda de cílios, como a perda de células epiteliais e a presença de infiltrados inflamatórios, de degeneração de glândulas e de hiperplasia epitelial, enquanto que na avaliação da ciliostase o único parâmetro avaliado é o batimento ciliar.

Neste período as lesões traqueais em ambos os grupos regridem e há uma certa regeneração do epitélio ciliado devido as respostas imunológicas das aves neste período de 10 dpi, dados que correlacionam-se com os das técnicas de detecção viral e ciliostase, além das respostas imunes humorais locais e sistêmicas e respostas imunes celulares.

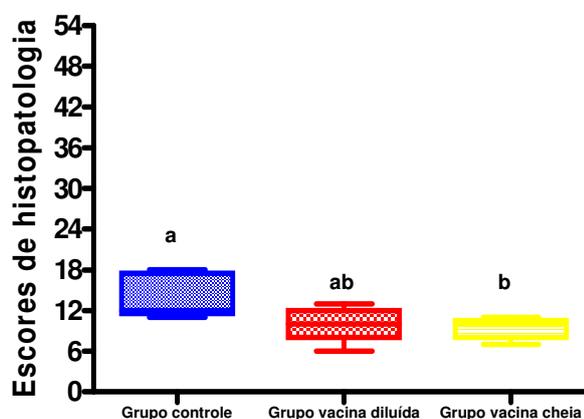


Figura 28. Comparação entre os resultados de escores da histopatologia no décimo dia pós-desafio. Estão indicados na figura mediana e erro padrão da média. (a,b) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

A resposta imune celular induzida pela vacinação por via mucosa, analisada nesse estudo através da expressão de genes imune-associados como os marcadores das células T CD8+ e de sua atividade citotóxica (Granzima A), no tecido traqueal de aves vacinadas e posteriormente desafiadas com o VBI, mostrou-se adequada para a avaliação do estado de proteção das aves contra a infecção pelo VBI, uma vez que as aves previamente vacinadas apresentaram tanto no primeiro quanto no quinto dpi, níveis mais elevados na expressão desses genes, quando comparados as aves do grupo controle, fato que assegurou a aquelas aves uma proteção efetiva frente ao VBI. Já no grupo controle tais níveis começaram a subir no quinto dpi, mas alcançaram seus picos no décimo dpi, dia no qual as aves deste grupo apresentaram os menos escores de histopatologia, ciliostase e detecção viral, aliado a altos índices de anticorpos culminando na proteção mais tardia destas aves.

A resposta imune humoral no compartimento local (secreção lacrimal) demonstrou que pode ser utilizada como um marcador de proteção principalmente em relação aos anticorpos anti-VBI do isótipo IgG e em menor escala dos isótipos IgM e IgA, pois as aves vacinadas apresentaram precocemente níveis mais elevados de anticorpos devido a presença de células de memória advindas da exposição prévia ao VBI (através da vacinação), quando comparadas ao grupo controle, valores os quais estão diretamente relacionados com o estado de proteção destas aves frente ao desafio com o VBI.

No compartimento sistêmico (soro sanguíneo) os isótipos IgG, IgA e IgM nos grupos vacinados apresentaram níveis elevados já no quinto dpi e permaneceram até o décimo dpi, enquanto que no grupo controle apenas no décimo dpi tais níveis subiram resultando na proteção tardia destas aves não vacinadas. Tais níveis neste compartimento permaneceram abaixo dos encontrados na secreção lacrimal, demonstrando que a resposta imune humoral local está mais correlacionada com a proteção das aves contra o VBI.

As técnicas de ciliostase e histopatologia apresentaram perfis semelhantes, nos quais os escores maiores foram encontrados no quinto dpi e em aves não vacinadas, período o qual estas aves apresentaram imunidades humoral e sistêmica

bem reservadas quando comparadas aos grupos vacinados e principalmente ao grupo vacinado com dose cheia. Neste mesmo período e no décimo dpi, a detecção do VBIg foi maior no grupo controle em relação aos vacinados, fato que comprova que o VBIg é o agente infeccioso que está causando as lesões nestas aves, apresentando ainda sintomatologia clínica neste grupo não vacinado, e que a vacinação prévia confere proteção através da imunidade humoral e celular uma vez que nos grupos vacinados a detecção do VBIg foi baixa.

As diferenças significativas nos parâmetros levantados pelos mais diversos métodos empregados nesse estudo foram sempre em relação ao grupo controle, composto por aves não vacinadas, e o grupo que recebeu dose cheia de vacina contra o VBIg, o que nos permite inferir que a dose cheia da vacina composta pela estirpe atenuada H-120 do VBIg é capaz de conferir uma proteção melhor do que a dose diluída dessa mesma preparação vacinal.

Ao relacionar os níveis das respostas imunes celulares e humorais detectadas em aves vacinadas com as de aves não vacinadas com a intensidade dos efeitos deletérios provocados na traquéia pelo desafio com a estirpe virulenta M-41 do VBIg, pode-se inferir que há uma associação relevante entre o estado de proteção das aves com altos níveis na expressão dos genes dos marcadores CD8+ e Granzima A de células T citotóxicas, bem como com os altos níveis dos anticorpos anti-VBIg dos isótipos IgG, IgM e IgA principalmente no compartimento local (secreção lacrimal), os quais foram associados com uma detecção mais reduzida do VBIg na traquéia de aves imunizadas com dose cheia da vacina e também com baixos escores de ciliostase e de lesões histológicas, nesse mesmo órgão, o que caracteriza um excelente estado de proteção as aves vacinadas com a dose cheia da vacina H-120 do VBIg.

VI. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos com esta pesquisa, na forma como foi concebida e executada, permite-se concluir que:

- Uma única dose de 10^4 DIE₅₀ por ave da vacina H-120 foi suficiente para garantir proteção a pintinhos vacinados com um dia de idade frente ao desafio com a amostra virulenta M-41 na dose de 10^5 DIE₅₀, utilizando como parâmetros de avaliação a ciliostase traqueal, a histopatologia, a detecção do genoma viral na traquéia dessas aves e a resposta imune humoral e celular.
- A resposta imune humoral na secreção lacrimal contra o VBI mensurada pelos testes de S-ELISA-ConA apresentou uma associação significativa com o estado de proteção ao desafio em aves vacinadas e desafiadas com o VBI, sendo que os anticorpos pertencentes aos isótipos IgG, IgA e IgM, revelaram-se bons indicadores de proteção ao desafio em aves vacinadas com o VBI, ficando caracterizado, assim, a importância desse tipo de resposta imune na proteção contra esse vírus.
- Os anticorpos anti-VBI dos isótipos IgG e IgM do compartimento sistêmico, embora em níveis mais reduzidos do que no compartimento local, revelaram-se também indicadores de imunidade protetora contra o VBI em aves vacinadas e desafiadas com esse mesmo vírus.
- A resposta imune celular mediada pelas células T citotóxicas junto à mucosa traqueal contra o VBI mensurada pela expressão dos genes de CD8+ e de granzima A apresentou uma associação significativa com o estado de proteção ao desafio em aves vacinadas e desafiadas com o VBI, ficando caracterizada assim, a importância desse tipo de resposta imune na proteção contra esse vírus.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMANN, A. H. Citocinas. In: ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**, 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, cap.11. p.251-282, 2005.

AITKEN, I. D., PARRY, S. H. AND DONNELLY, M. E. Collecting avian lachrymal fluid. **Veterinary Record**, v. 96 , p. 491-492, 1975.

AMBROSIUS, H.; HADGE, D. Chicken Immunoglobulins. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.17, p.57-67, 1987.

ANDRADE, L.F. VILLEGAS, P., FLECHER, O.J.; LAUDENCIA, I.R. Evaluation of ciliary's movement in tracheal rings to assess immunity against Infectious Bronchitis Virus. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 267, p. 805-825, 1982.

ARIANNS, et al. The role of phagocytic cells in enhanced susceptibility of broilers to colibacillosis after Infectious Bronchitis Virus infection. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.123, n.3-4, p.240-50, 2008.

ASSAYAG, M. S. Bronquite infecciosa das galinhas. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA 5., 2004, Chapecó, SC. **Anais ...** Chapecó: p.43-46, 2004.

BABA, T.; KAWATA, T.; MASUMOTO, K. Role of the harderian gland in immunoglobulin A Production in chicken lacrimal fluid. **Research Veterinary Science**, v.49, p.20-4,1990.

BHATTARCHARJEE, P. S.; NAYLOR, C. J.; JONES, R. C. A simple method for immunofluorescence staining of tracheal organ cultures for the rapid identification of infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, Cambs, v.23, n.1, p.471-480, 1994.

BOES, M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. **Molecular Immunology**, v. 37, p.1141-1149, 2000.

BOLTZ, D. A.; NAKAY, M.; BAHR, J. M. Avian Infectious Bronchitis virus: a possible causes of reduced fertility in the rooster. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 48, p. 909-915, 2004.

BRONZONI, R. V. M. et al. Detection of Infectious Bronchitis Virus and Specific Anti-Viral Antibodies using a concanavalin A-Sandwich-ELISA. **Viral Immunology**, v. 18, n. 3, p. 569-578, 2005.

BRONZONI, R.V.M.; PINTO, A.A.; MONTASSIER, H.J. Detection of Infectious Bronchitis Virus in experimentally infected chickens by antigen-competitive ELISA. **Avian Pathol.**, Cambs, v.30, p.67-71, 2001.

BUTCHER, G.D.; WINTERFIELD, R.W.; SHAPIRO, D.P. Na outbreak of nephropathogenic H13 Infectious Bronchitis in commercial broilers. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 33, p. 823-826, 1989.

CALLISON, S. A. et al. Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. **J. Virol Methods**, Amsterdam, v.138, n.1-2, p.60-65, 2006.

CAPUA, I. et al. Co-circulation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts). **Avian Pathol.**, Cambs, v.28, n.5, p.587-92, 1999.

CARDOSO, T. C.; MONTASSIER, H.J.; GALLETTI, M.C.M.; PINTO, A.A. Development and application of a sandwich ELISA to measure chicken antibodies of infectious bronchitis virus. **Virus Reviews and Research**, v.1, p.75-80, 1996a.

CARDOSO, T. C.; MONTASSIER, H.J.; GALLETI, M.C.M.; PINTO, A.A. Evaluation of an indirect ELISA method for the detection of chicken antibodies of infectious bronchitis virus. **Revista de Microbiologia**, v.27, p.64-69, 1996b.

CAVANAGH, D. Advances in avian diagnostic technology. In: WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION CONGRESS 10., Sidney. **Proceedings...**p.57-70, 1993.

CAVANAGH, D., NAQI, S. Infectious Bronchitis. In : CALNEK, B.W., BARNES, H.J., BEARD, C.W. *et al.* **Diseases of poultry**. 10 ed. Ames: Iowa State University Press, 511-526, 1997.

CAVANAGH, D. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 32, p. 567-582, 2003.

CAVANAGH, D.; NAQI, S. Infectious Bronchitis. In : BARNES, H.J. *et al.* **Diseases of poultry**. 11. ed. Ames: Iowa State University Press, p.101-119, 2003.

CAVANAGH, D. Review article: Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Vet. Research.**, v.38, 281-297, 2007.

CAVANAGH, D. Coronaviruse in poutry and other birds. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 34, n.6, p. 439-448, 2005.

CLOUGH, N. C.; ROTH, J. A. Effector mechanisms. In: CLOUGH, N. C.; ROTH, J. A. **Understanding immunology**, 1. ed. St. Louis: Mosby, cap. 4. p. 79-143, 1997.

COLLISSON, E. W., *et al.* Detection of avian infectious bronquites using in situ hybridization and recombinant DNA. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.24, n.3, p.261-271, 1990.

COLLISSON, E. W. et al. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 24, p. 187-200, 2000.

COLLISSON, E. W. et al. Memory T cells protect chicks from acute infectious bronchitis virus infection. **Virology**, v. 306, p. 376-384, 2003.

COOK, J.K.A. et al. The secretory antibody response of onbred lines of chickens to avian infectious bronchitis virus infection. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 21, n. 3, p. 681-692, 1992.

COOK, J.K.A.; DARBYSHIRE, J.H.; PETERS, R.W. The use of chicken tracheal organ cultures for the isolation and assay of avian Infectious Bronchitis Virus. *Archives Virol.*, v.50, p.109-118, 1976.

CUBILLOS, A; et al. Characterization of strains of infectious bronchitis virus isolated in Chile. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v.20, p.85-99, 1991.

DARBYSHIRE, J. H.; PETERS, R. W. Humoral antibody response and assesmente of protection following primary vaccination of chickens with maternally derived antibody against avian infectious bronchitis virus. **Research in Veterinary Science**, v.38, p.14-21, 1985.

DARBYSHIRE, J.H. Assessment of cross-immunity in chickens to strains of avian infectious bronchitis virus using tracheal organ cultures. **Avian Pathol.**, Huntingdon, 9: 179-184, 1980.

DAVELAAR, F. G.; NOORDZIJ, A.; VANDER DONK, J. A. A study on the synthesis and secretion of immunoglobulins by the harderian gland of the fowl after eyedrop vaccination against infectious bronchitis at 1 day-old. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 11, p.63-79, 1982.

De WIT, J.J. Detection of infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 29, n 1, p. 71-93, 2000.

De WIT, J.J.; DAVELAAR, F.G.; BRAUNIUS, W.W. Comparasion of the enzyme linked immunosorbent assay, the haemagglutination-inhibition test and agar gel precipitation test for the detection of antibody against infectious bronchitis and Newcastle disease in commercial broilers. **Avian Pathol.**, Cambs, v.21, p.651-8, 1992.

DHINAKAR, R. G.; JONES, R. C. Immunopathogenesis of infection in SPF chickens and commercial broiler chickens of variant infectious bronchitis virus of economic importance. **Avian Pathol.**, Cambs, v.25, n.3, p.481-501, 1996.

DHINAKAR, R. G.; JONES, R. C. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in chickens. **Avian Pathol.**, Cambs, v.26, n.4, p.677-706, 1997.

DI FÁBIO, J. Bronquite infecciosa das galinhas: aspectos clínicos e controle da BIG no Brasil. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Santos, SP. **Anais ...** Campinas : FACTA, 1993, p.1-8, 1993.

DI FÁBIO, J.; ROSSINI, L. I. Bronquite infecciosa das galinhas. In: BERCHIERI JR. A.; MACARI, M. **Doença das aves**. 1 Ed. Campinas: FACTA, p.293-300, 2000..

DI FÁBIO, J.; ROSSINI, L. I.; ORBELL, S. J.; PAUL, G.; HUGGINS, M. B.; MALO, A.; SILVA, B. G. M; COOK, J. K. A. Characterization of Infectious Bronchitis Vírus isolates from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. **Avian Dis.**, Kennet Square, v.44, p.582-589, 2000.

ESCUTENAIRE, S. et al. SYBR Green real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the generic detection of coronaviruses. **Arch. Virol.**, Vienna, v.152, 41-58, 2007.

FULTON, R. M.; REED, W. M.; TRACKER, H. L. Cellular response of the respiratory tract of chickens to infection with Massachusets 41 na Australian T infectious bronchitis viruses. **Avian Dis.**, Kennet Square, v.37, p.951-60, 1993.

GARCIA, Z.; BANKOWSKI, R.A. Comparison of a tissue-culture virus neutralization test and enzyme-linked immunosorbent assay for a measurement of antibodies to Infectious bronchitis. **Avian Dis.**, Kennet Square, v.25, p.121-130, 1981.

GELB, Jr, J. Infectious bronchitis. In: PURCHASE, H.G. et al. **A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**, 3. ed. Kennett Square: American Association of Avian Pathologists, p.124-127, 1989.

GELB Jr, J.; WOLFF, J. B.; MORAN, C. A. Variant serotypes of Infectious BronchitisVirus isolated from commercial layer and broiler chickens. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 35, n. 1, p. 82-87, 1991.

GELB Jr. J.; WOLFF, J. B.; MORAN, C. A. Infectious bronchitis virus antibodies in tears and their relationship to immunity. **Avian Dis.**, Kennet Square, v.42, p.364-74, 1998.

GILLETTE, K. G.; Local antibody response in avian infectious bronchitis: virus-neutralization antibody in tracheobronchial secretions. **Avian Dis.**, Kennet Square, v.25, p.431-443, 1981.

GÖBEL, T. W. F.; KASPERS, B.; STANGASSINGER, M. NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken. **Int. Immunol.**, v.13, p.757–762, 2001.

GUO, X., et al. Molecular mechanisms of primary and secondary mucosal immunity using avian infectious bronchitis virus as a model system. **Vet. Immunol. Immunopatol.**, v.121, p.332–343, 2008.

HANDBERG, K. J. et al. Detection and strain Differentiation of infectious bronchitis virus in tracheal tissues from experimentally infected chickens by reverse transcription-polymerase chain reaction. Comparison with an immunohistochemical technique. **Avian Pathol.**, Cambs, v.28, n.4, p.327-335, 1999.

HAWKES, R.A. DARBYSHIRE, J. H.; PETERS, R. W.; MOCKETT, A. P. A.; CAVANAGH, D. Presence of viral antigens and antibody in the trachea of chickens infected with avian infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, Cambs, v.12, p.331-40, 1983.

HIPÓLITO, O. Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. **Arq. Esc. Sup. Vet. MG**, Belo Horizonte, v.10, p.131-63, 1957.

HIPÓLITO, O.; BOTTINO, J. A.; PINTO, A. A. Estudos de duas amostras de vírus isoladas de casos da “síndrome nefrite-nefroze” das galinhas no Brasil. **Ciênc. Cult.**, São Paulo, v.25, p.569, 1973.

HOFSTAD, M.S. Avian infectious bronchitis. In: HOFSTAD, M.S. et al., **Disease of Poultry**, Ed. 7th, Ames Iowa: The Iowa State University Press, p.487-503, 1976.

HOLMES, H. C. Neutralizing antibody in nasal secretions of chickens following administration of avian infectious bronchitis virus. **Archives Gesante Virusforseh**, v.43, p.235-41, 1973.

HONG, Y. H. et al. Analysis of chicken cytokine and chemokine gene expression following *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. **Vet. Immunol. Immunopatol.**, v.114, p.209-223, 2006.

HOPKINS, S. R. Serological comparisons of strains of infectious bronchitis virus using plaque purified isolants. **Avian Dis.**, Kennet Square, v.18, n.2, p.231-239, 1974.

IGNJATOVIC, J; ASHTON, F. Detection and differentiation of avian infectious bronchitis viruses using antibody-based ELISA. **Avian Pathol.**, Cambs, v.25, p.721-736, 1996.

JACKWOOD, M. W.; KWON, H. M.; HILT, D. A. Infectious bronchitis virus detection in allantoic fluid using the polymerase chain reaction and a DNA probe. **Avian Dis.**, Kennett Square, v.36, n.2, p.403-409, 1992.

JACKWOOD, M. W.; YOUSEF, N. M. H.; HILT, D. Further development and use of a molecular serotype identification test for infectious bronchitis virus. **Avian dis.**, Kennet Square, v.41, n.1, p.105-110, 1997.

JANSE, E.M., Van ROOZELAAR, D. and KOCH, G. Leukocyte subpopulations in kidney and trachea of chickens infected with infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v.23, p.513-23, 1994.

JEURISSEN, S. H. M.; VELVERDE, L.; JANSE, E. M. Structure and function of lymphoid tissues of the chicken. **Poultry Science**, V.5, p.183-207, 1994.

JOHNSON, R.B.; NEWMAN, J. A.; WILLS F.K. Titration of infectious bronchitis virus in tracheas of susceptible and immune chickens. **Avian Dis.**, Kennet Square, v.13, p.632-635, 1969.

JONES, R.C.; AMABALI, A.G. Re-excretion of na enterotropic infectious bronchitis virus by hens at point of lay after experimental infection at day-old. **Veterinary Record**, v.120, p.617-9, 1987.

KANTOR, A.B.; HEZENBERG, L.A. Origin of murine B cell lineages. **Annu. Rev. Immunol.**, v.11, p.501-538, 1993.

KEELER, C. L. et al. Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of the peplomer (S-1) gene. **Avian Dis.**, Kennett Square, v.42, n.2, p.275-84, 1998.

KING, D.J.; CAVANAGH, D. Infectious bronchitis. In: CALNEK, B.W.; BARNES, H.J.; BERAD, C.W.; REID, W.M.; YODER, J.R. **Diseases of poultry**. 9 ed. Ames Iowa: Iowa State University Press, p.471-484, 1991.

KWON, H. M.; JACKWOOD, M. W.; GELB Jr, J. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **Avian Dis.**, Kennet Square, v.37, n.1, p.194-202, 1993.

LANCELLOTTI, M.; MONTASSIER, H.J. . Relationship between tear antibody levels and immunity to infectious bronchitis virus. In: **I Mercosul Symposium on respiratory viruses**, 2002, Ribeirão Preto. I Mercosul Symposium on respiratory viruses, 2002.

LANCER, J.A.; HOWARD, C.R. The polypeptides of infectious bronchitis virus (IBV-41 strain). **Journal of General Virology**, v.46, p.349-361, 1980.

LIVAK K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. **Methods**. v.25, n.4, p.402-408, 2001.

LUTTICKEN, D.; RIJKE, E. O.; LOEFFEN, A. H. C. Systemic and local antibody responses in chickens after infection and vaccination with infectious bronchitis virus. In: Avian Immunology. WEBER, W. T. eds. **Progress in Clinical and Biological Research**, v.238, p.321-30, 1987.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Survey and summary: Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Res.**, Oxon, v.30, n.6, p.1292-1305, 2002.

MARQUARDT, W.W.; KADAVIL, S.K.; SNYDER, D.B. Comparison of ciliary activity and virus recovery from tracheas of chickens and humoral immunity after inoculation with serotypes of avian infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, Kennet Square, v.26, p.828-234, 1982.

MARTINS, N.R.S.; MOCKETT, A.P.A.; COOK, J.K.A. IgM responses in chickens serum to live and inactivated Infectious Bronchitis Virus. **Avian Dis.**, Kennet Square, v.35, p.470-475, 1991.

MATTHIJS, M.G.R. et al. Course of infection and immune responses in the respiratory tract of IBV infected broilers after superinfection with E. coli. **Vet. Immunol. Immunopatol.**, v.27, n.1-2, p.77-84, 2009.

MOCKETT, A.P.A.; COOK, J.K.A. The detection of specific IgM to Infectious Bronchitis virus in chicken serum using ELISA. **Avian Pathol.**, Cambs, v.15, p.437-446, 1986.

MOCKETT, A.P.A.; DARBYSHIRE, J.H. Comparative studies with an enzyme linked immunosorbent assay for antibodies to avian Infectious Bronchitis virus. **Avian Pathol.**, Cambs, v.10, p.1-10, 1981.

MONDAL, S.P.; NAQI, S.A. Maternal antibody to infectious bronchitis virus: its role in protection against infection and development of active immunity to vaccine. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.79, p.31-40, 2001.

MONTASSIER, H.J. Enfermidades do Sistema Imune. In: BERCHIERI JR. A.; MACARI, M. **Doença das aves**. 1 Ed. Campinas: FACTA, p.133-150, 2000.

MONTGOMERY, R. D.; MASLIN, W. R.; BOYLE, C. R. Effects of Newcastle disease vaccines and Newcastle disease/infectious bronchitis combination vaccines on the head – associated lymphoid tissues of the chicken. **Avian Dis.**, v.41, n. 2, p.399-406, 1997.

NAKAMURA, K. et al. Comparative study of respiratory lesions in two chicken lines of different susceptibility, infected with infectious bronchitis virus: histology, ultrastructure and immunochemistry. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v.20, p.245-61, 1991.

NAQI, S.A.; KARACA, K.; BAUMAN, B. A monoclonal antibody-based antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for identification of IBV serotypes. **Avian Pathol.**, Cambs, v.22, p.555-564, 1993.

NIESTERS, H. G. M. Molecular and diagnostic clinical virology in real time. **Clin. Microbiol. Infect.**, Oxford, v.10, n.1, p.5-11, 2004.

NIESTERS, H. G. M. Epitopes on the peplomer protein of infectious bronchitis virus strain M41 as defined by monoclonal antibodies. **Virology.**, v.161, n.2, p. 511-520, 1987.

OKINO, C.H., MONTASSIER, M.F.S., GIVISIEZ, P.E.N, FURUYAMA, C.R.A.G., BRENTANO, L., MONTASSIER, H.J. Infectious Bronchitis Virus: Detection and vaccine strain differentiation by semi-nested RT-PCR. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, Campinas, v.7, n.1, p.59-66, 2005.

OWEN, R. L. et al. Detection of viral antigen following exposure of one-day-old chickens to the Holland-52 strain of IBV. **Avian Pathol.**, Cambs, v.20, n.4, p.663-673, 1991.

PARDO, J. et al. Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL- mediated target cell lysis. **J. Cell. Biol.**, v.167, p.457-468, 2004.

PEREIRA, N.A. et al. Uma nova estirpe brasileira do vírus da bronquite infecciosa causadora de lesões gonadais e a proteção cruzada induzida pela vacina comercial atenuada. **Biológico**, São Paulo, v. 68, p.250-254, 2006.

RAJ, G. D. et al. Egg: embryo weight ratio as an indicator of dwarfism induced by infections bronchitis virus. **Avian Pathol.**, Cambs, v.33, n.3, p.307-309, 2004.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent end points. **Am. J. Hyg.**, Baltimore, v.27, p.493-97, 1938.

RUSSEL, P.H. Newcastle disease virus: virus replication in the harderian gland stimulates lacrimal IgA; the yolksac provides early lacrimal IgG. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.37, p.151-63, 1993.

SAIF, L. J.; Van COTT, J.; BRIM, T.; SESTAK, K.;WEILNAU, P. Mucosal immunity to enteric (TGEV) and respiratory (PRCV) coronaviruses in a swine model of enteric disease: Interrelationships between GALT and MALT. In: **International Veterinary Immunology Symposium**, n. 4, p. 65, 1995.

SARSON, A. J. et al. Transcriptional Analysis of Host Responses to Marek's Disease Viral Infection. **Viral Immunol.**, v. 19, n. 4, p. 747-758, 2006.

S.A.S. INSTITUTE INC. S.A.S./STAT - **User's guide, release 6, 12 TS level 0020.**
Cary. 1995, p.519-48.

SEO, H. S. et al. Specific cytotoxic T lymphocytes are involved in vivo clearance of infection. **J. Virol.**, v.71, p. 5173-5180, 1997.

SEO, S.H. and COLLISSON, E.W. Specific cytotoxic T lymphocytes are involved in in vivo clearance of infectious bronchitis virus. **J. Virol.** **71**, pp. 5173–5177, 1997.

SILVA, J. M. L. Bronquite infecciosa das galinhas: como e quando introduzir novas vacinas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1989, São Paulo, SP. **Anais...** Campinas: FACTA, p.75-79, 1989.

STOHLMAN, S. A. Mouse hepatitis virus nucleocapsid-specific cytotoxic T lymphocytes protect from lethal infection without eliminating virus from the central nervous system. **J. Virol.**, Washington, v. 69, p. 684, 1995.

TIMMS, L.M. and BRACEWELL, C.D. Cell mediated and humoral immune response of chickens to inactivated oil-emulsion infectious bronchitis vaccines. **Research in Veterinary Science**, v.34, p.224-30, 1983.

TORO, H.; FERNANDEZ, I. Avian Infectious Bronchitis: Specific lacrymal IgA level and resistance against challenge. **Journal of Veterinary Medicine**, v.41, p.467-472, 1994.

TORO, H. et al. Avian Infectious bronchitis: viral persistence in the Harderian gland and histological changes after eye-drop vaccination. **Avian Dis.**, Kennet Square, v.40, p.114-20, 1996.

TORO, H.; ESPINOSA, C.; PONCE, V.; ROJAS, V.; MORALES, M. A.; KALETA, E. F. Infectious bronchitis: effect of viral doses and routes on specific lacrimal and serum antibody responses in chickens. **Avian Dis.**, Kennet Square, v.41, n. 2, p.379-87, 1997.

WANG, X. et al. Transcriptome of local innate and adaptive immunity during early phase of infectious bronchitis viral infection. **Viral Immunol.**, v.19, p.768-774, 2006.

WANG, C.H.; HSIEH, M.C.; CHANG, P.C. Isolation, pathogenicity and H₁₂₀ Protection Efficacy of Infectious Bronchitis Viruses Isolated in Taiwan. **Avian Dis.**, Kennet Square, v.40, p.620-625, 1996.

WANG, C. H.; TSAI C. T. Genetic grouping for the isolates of avian infectious bronchitis virus in Taiwan. **Arch. Virol.**, Vienna, v.141, n.9, p.1677-1688, 1996.

YASHIDA, S.; AOYAMA, S.; SAWAGUCHI, K.; TAKAHASHI, N.; IRITANI, Y.; HAYASHI, Y. Relationship between several criteria of challenge-immunity and humoral immunity in chickens vaccinated with avian infectious bronchitis vaccines. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v.14, p.199-211, 1985.

ZAVALA, G. La solidez Imunológica es Esencial para el aparato Respiratório. In: **Congreso Latino Americano de Avicultura**, n.16, p.40-3, 1999.

ZELLEN, G.H.; THORSEN, J. Standardization and application of the enzyme-linked immunosorbent assay for Infectious Bronchitis. **Avian Dis.**, Kennet Square, v.30, p.695-698, 1986.