UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

IMUNIDADE CELULAR E HUMORAL NO TRATO RESPIRATÓRIO DE GALINHAS DESAFIADAS COM O VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA E EFEITO DE SUBDOSAGENS DA VACINA NA INDUÇÃO DE PROTEÇÃO

Cintia Hiromi Okino

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Novembro de 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

IMUNIDADE CELULAR E HUMORAL NO TRATO RESPIRATÓRIO DE GALINHAS DESAFIADAS COM O VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA E EFEITO DE SUBDOSAGENS DA VACINA NA INDUÇÃO DE PROTEÇÃO

Cintia Hiromi Okino

Orientador: Prof. Dr. Hélio José Montassier

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Novembro de 2010

Okino, Cintia Hiromi
O41i Imunidade celular e humoral o trato respiratório de galinhas desafiadas com o vírus da bronquite infecciosa e efeito de subdosagens da vacina na indução da proteção/ Cintia Hiromi Okino. – -Jaboticabal, 2010
xx, 115 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientador: Hélio José Montassier
Banca examinadora: Adolorata Aparecida Bianco Carvalho, Clarice Weins Arns, Geraldo Aleixo da Silva Passos Júnior, Liana Brentano
Bibliografia

1. Bronquite Infecciosa Aviária. 2. Imunidade mucosa. 3. PCR em tempo real. 4. Vacina. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.988:636.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
E-mail do autor: c_okino@yahoo.com.br

unesp **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: IMUNIDADE CELULAR E HUMORAL NO TRATO RESPIRATÓRIO DE GALINHAS DESAFIADAS COM O VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA E EFEITO DE SUBDOSAGENS DA VACINA NA INDUÇÃO DE PROTEÇÃO

AUTORA: CINTIA HIROMI OKINO

ORIENTADOR: Prof. Dr. HELIO JOSE MONTASSIER

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA , Área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. HELIO JOSE MONTASSIER
Departamento de Patologia Veterinaria / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. LIANA BRENTANO
Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves / Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria / Concórdia/SC

Profa. Dra. ADOLORATA APARECIDA BIANCO CARVALHO
Departamento de Med Vet Prev e Repr Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. CLARICE WEIS ARNS
Departamento de Microbiologia e Imunologia / Universidade Estadual de Campinas / Campinas/SP

Prof. Dr. GERALDO ALEIXO DA SILVA PASSOS JUNIOR
Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia / Faculdade de Odontologia - USP / Ribeirão Preto/SP

Data da realização: 26 de novembro de 2010.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

CINTIA HIROMI OKINO – nascida em São Paulo, no dia 07 de agosto de 1982, graduou-se em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV – UNESP), Campus de Jaboticabal, em janeiro de 2005. Entre dezembro de 2000 e julho de 2002 realizou estágio e trabalho de iniciação científica na área de bioquímica e biologia molecular, sob orientação da Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, professora titular do Departamento de Tecnologia da FCAV – UNESP – Campus de Jaboticabal. Entre agosto de 2002 e junho de 2004 desenvolveu trabalho de iniciação científica na área de biologia molecular e virologia de aves, sob orientação do Prof. Dr. Hélio José Montassier. Nos meses de junho a agosto de 2004 realizou estágio de graduação na área de Sanidade Animal, no Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPSA), órgão da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), sob supervisão da Dra. Liana Brentano. Em 2004, defendeu a monografia de conclusão de curso intitulada "Desenvolvimento e aplicação das técnicas de RT-PCR e Semi-Nested-RT-PCR para a detecção e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas" orientada pelo Prof. Dr. Hélio José Montassier. Em fevereiro de 2007, defendeu dissertação de mestrado "Desenvolvimento da técnica de PCR em tempo real para detecção e diferenciação de estirpes do vírus da Bronquite Infecciosa das galinhas", na área de Patologia Animal, sob orientação do Prof. Dr. Hélio José Montassier. Em março de 2007 iniciou curso de doutorado, sob orientação do Prof. Dr. Hélio José Montassier, na área de Patologia Animal. Em julho de 2009, iniciou atividades na área de vigilância epidemiológica e sanitária na Secretaria de Saúde do município de Lins – SP. Em abril de 2010, iniciou atividades com distribuição comercial e suporte técnico de kits de diagnóstico de ELISA de doenças de aves e suínos.

Dedico esse trabalho, que foi conduzido com muita dedicação e carinho...

Aos meus pais,

Que sempre lutaram ao meu lado, tornando os obstáculos em minha vida mais fáceis de serem ultrapassados. Muito obrigada por todo amor, carinho, paciência e dedicação. Agradeço a Deus todos os dias pela benção que é ter vocês ao meu lado. Com certeza, mais essa conquista também é mérito de vocês.

À minha irmã,

Minha companheira e grande amiga, acima de qualquer outro vínculo. Nossas diferenças completam quem somos e nos ajudam a enfrentar as dificuldades que a vida nos oferece.

Aos animais,

Acredito que na alma de cada veterinário existe um amor incondicional pelos animais, assim como na deles por nós. Em especial à minha pretinha querida, Tammy, que se foi e deixou tanta saudade, à Tina e à Fiona, que preenchem com alegria cada pedacinho das nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

À Deus,

Por ter sempre iluminado meu caminho e permitido cumprir mais esta etapa.

Aos meus pais,

Se eu pudesse descrever tudo o que devo agradecer a eles, seriam necessárias todas as páginas dessa tese, e ainda assim não seriam suficientes. Agradeço por toda dedicação de vocês, que fizeram com que boa parte dos meus sonhos se tornasse realidade.

Ao Prof. Hélio José Montassier,

Foram mais de oito anos de orientação e convivência. Com certeza, mais essa conquista não teria o mesmo conteúdo se não fosse por ele. Muito obrigada pela amizade, dedicação, confiança, por acreditar em meu esforço, e pela oportunidade de ter desenvolvido mais este trabalho.

Aos amigos do Laboratório: Aliandra, Camila, Igor, Ketherson, Mariana, Fátima, Lurdinha, Phillip e Felipe,

Pela amizade, pelo auxílio durante meu experimento e principalmente, pelos bons momentos de convivência. Um agradecimento especial à Lurdinha pela colaboração no desenvolvimento dos ensaios de ELISA.

À minha família e amigos,

Em especial à minha irmã; ao Saulo (meu cunhadinho “adorável”); à minha avó Nair; ao meu padrinho; à Manu (minha fonte das melhores risadas); à Jô (alguns amigos não precisam estar conosco todos os dias, o que conforta é saber que estarão sempre ali); ao Léo (pela agradável companhia e por me emprestar os ouvidos inúmeras vezes); aos amigos de longe: Cinthia, Tocera e Kronka (que são

prova de que os verdadeiros amigos carregamos conosco por toda a vida, independente da distância e das dificuldades); às meninas da Kabaré; aos da Suiaves e Ammco Pharma; e aos amigos não nominalmente citados, conquistados nesse período ou não, que certamente, e até muitas vezes sem saber, ajudaram-me a vencer muitas barreiras.

Muito obrigada por todas as alegrias e dificuldades compartilhadas.

Ao Prof. Antônio Carlos Alessi, à Lia e Chica.

Pelo auxílio durante a confecção e avaliação dos achados de histopatologia.

Aos membros da banca examinadora do exame geral de qualificação e de defesa: Profa. Dra. Adolorata Bianco Carvalho, Prof. Dr. Ângelo Berchieri Júnior, Prof. Dr. Antônio Carlos Alessi, Prof. Dr. Aramis Augusto Pinto, Profa. Dra Clarice Weis Arns, Prof. Dr Geraldo Aleixo da Silva Passos Júnior e Dra Liana Brentano.

Pelas sugestões concedidas que contribuíram para melhorar este trabalho.

Ao Prof. Gener Tadeu,

Pelo auxílio com as análises estatísticas.

À Unesp – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,

Pela oportunidade oferecida para a realização do curso.

À FortDodge,

Pela doação dos pintinhos SPF.

À Embrapa Suínos e Aves

Pela doação da estirpe viral M41.

À MERIAL,

Pela doação dos ovos embrionados SPF.

À FAPESP,

Pela concessão da bolsa de Doutorado (proc. 07/55070-2).

Ao CNPq,

Pelo financiamento desse projeto (proc. 476120/2007-1).

À Ammco Pharma Saúde Animal,

Pela compreensão, nos dias em que precisei me ausentar para elaboração desse trabalho.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram com a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos

Sumário

Página

1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO DE LITERATURA 3
2.1 Bronquite infecciosa das galinhas 3
2.1.1 Etiologia 3
2.1.2 Patogenia da infecção pelo VBI 6
2.1.3 Vacinação contra o VBI 8
2.2 O Sistema Imune das galinhas 9
2.2.1 Noções gerais 9
2.2.2 Respostas imunes humorais em aves 10
2.2.3 Respostas imunes celulares em aves 12
2.2.4 Memória imunológica 19
3 HIPÓTESE DE TRABALHO 21
4 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS 22
5 MATERIAL E MÉTODOS 24
5.1 Vírus 24
5.2 Propagação da estirpe M41 do VBI em ovos embrionados SPF 24
5.3 Determinação da infectividade viral 25
5.4 Infecção experimental em galinhas 26
5.4.1 Delineamento experimental I 26
5.4.2 Delineamento experimental II 27
5.5 Mensuração de anticorpos locais e sistêmicos contra o VBI 28
5.6 Quantificação da expressão de genes relacionados às respostas imunes e da replicação viral 29
5.6.1 Extração de RNA total 29
5.6.2 Tratamento com DNAse 30
5.6.3 Transcrição reversa (RT) 31
5.6.4 PCR em tempo real 31
5.6.5 Construção da curva padrão 33
5.7 Avaliação da ciliostase 34

5.8 Histopatologia da traquéia....35
5.9 Análise estatística....36
6 RESULTADOS....38
6.1 Determinação da infectividade viral....38
6.2 Desenvolvimento e otimização dos ensaios para quantificação da expressão gênica e da replicação viral....38
6.2.1 Técnica de PCR em tempo real....38
6.2.2 Remoção de contaminação com DNA no RNA extraído pelo tratamento com enzima DNAse....40
6.2.3 Construção da curva padrão para quantificação da replicação viral....41
6.3 Delineamento experimental I....42
6.3.1 Mensuração de anticorpos locais e sistêmicos contra o VBI....42
6.3.2 Quantificação relativa da expressão de genes relacionados às respostas imunes....46
6.3.3 Quantificação absoluta da replicação viral....51
6.3.4 Avaliação da ciliostase....52
6.3.5 Histopatologia da traquéia....54
6.3.6 Correlações....59
6.4 Delineamento experimental II....62
6.4.1 Mensuração de anticorpos locais e sistêmicos contra o VBI....62
6.4.2 Quantificação relativa da expressão de genes relacionados às respostas imunes....69
6.4.3 Quantificação absoluta da replicação viral....74
6.4.4 Avaliação da ciliostase....75
6.4.5 Histopatologia da traquéia....77
6.4.6 Correlações....78
7 DISCUSSÃO....84
7.1 Delineamento experimental I....87
7.2 Delineamento experimental II....93
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS....101
9 CONCLUSÕES....104
10 REFERÊNCIAS....105

Lista de abreviaturas

Acs - Anticorpos
AIV – Vírus da Influenza aviária
aMPV – Metapneumovírus aviário
BI – Bronquite Infecciosa das Galinhas
CD8+ - Marcador de linfócito T citotóxico CD8+
CN – Controle negativo
CP – Controle positivo
CT – “Threshould Cycle”
CTL – Linfócito T citotóxico
DE – Desenvolvimento Embrionário
DEPC – Dietil-pirocarbonato
DIE – Dose Infectante Embrionária
DNA – Ácido desoxirribonucléico
dpi – dia pós-infecção
dpv – dia pós-vacinação
DTT – Dithiothreitol
ELISA – “Enzymed Linked Immunosorbent Assay”
H120 – Holland 120
HE – Hematoxilina-Eosina
HI – Inibição da Hemaglutinação
hpi – hora pós-infecção
HRV2 – Região de hipervariabilidade gênica 2
IFNγ - Interferon gamma
IL – Interleucina
ILT – Laringotraqueíte infecciosa
IV – Isolamento Viral
GraA – Granzima homóloga A
Kb – Quilobases ou 1000 unidades de bases

LCA – Líquido Cório Alantóide

LPD- Leite em pó desnatado

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal

OMS – Organização Mundial de Saúde

M41 – Massachussets 41

MHC – Complexo Maior de Histocompatibilidade

NDV – Vírus da doença de Newcastle

ng – Nanograma

NK – “Natural Killer”

pb – Pares de bases

PCR – “Polimerase Chain Reaction” - Reação em Cadeia da Polimerase

pg - Picograma

pi – Pós Infecção

RNA – Ácido ribonucléico

RNAm – RNA mensageiro

RT- “Reverse transcriptation” - Transcrição Reversa

rt RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

S – “Spike” - Glicoproteína de Superfície

SARS - Síndrome Respiratória Aguda Severa

S-ELISA-Con A - Sandwich-ELISA-Concanavalina A

SPF – “Specific Pathogen Free” – Livre de patógenos específicos

TA – Temperatura Ambiente

TGF – Fator de Crescimento de transformação

Tm – “Melting temperature” – Temperatura de dissociação

TNF – Fator de Necrose Tumoral

VBI –vírus da Bronquite Infecciosa

VDM- Vírus da doença de Marek

Lista de Figuras

Página

Figura 1. Representação esquemática do vetor pGEM T Easy (Promega), no qual foi clonado um fragmento do gene S1 da estirpe M41 do VBI. 35

Figura 2. Eletroforese em gel de agarose de fragmentos amplificados dos diferentes genes utilizados na quantificação relativa da expressão de genes relacionados às respostas imunes 40

Figura 3. Resultados obtidos a partir do teste para verificar a presença de DNA carreado durante extração de RNA. 41

Figura 4. A curva padrão foi gerada através do uso dos valores de C(T) vs. Log_{10} das diluições seriadas de razão 10 (10^{-3} a 10^{-9}) do DNA plasmidial correspondente ao gene S1 do VBI 42

Figura 5. Perfil cinético da produção de anticorpos do isótipo IgG anti-VBI detectados pelo S-ELISA-ConA nas amostras de soro das aves do Delineamento experimental I, nos diferentes intervalos pós-vacinação ou pós-infecção 43

Figura 6. Perfil cinético da produção de anticorpos do isótipo IgG anti-VBI detectados pelo S-ELISA-ConA nas amostras de lágrima das aves do Delineamento experimental I, nos diferentes intervalos pós-vacinação (pv) ou pós-infecção 44

Figura 7. Perfil cinético da produção de anticorpos do isótipo IgM anti-VBI detectados pelo S-ELISA-ConA nas amostras de soro das aves do Delineamento experimental I, nos diferentes intervalos pós-vacinação ou pós-infecção 44

Figura 8. Perfil cinético da produção de anticorpos do isótipo IgM anti-VBI detectados pelo S-ELISA-ConA nas amostras de lágrima das aves do Delineamento experimental I, nos diferentes intervalos pós-vacinação ou pós-infecção 45

Figura 9. Perfil cinético da produção de anticorpos do isótipo IgA anti-VBI detectados pelo S-ELISA-ConA nas amostras de lágrima das aves do Delineamento experimental I, nos diferentes intervalos pós-vacinação ou pós-infecção 45

Figura 10. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador do marcador de linfócito T citotóxico CD8+, das aves dos grupos desafiados vacinado e não vacinado, nos diferentes intervalos pós-desafio... 47

Figura 11. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador da Granzima homóloga A, das aves dos grupos desafiados vacinado e não vacinado, nos diferentes intervalos pós-desafio 48
Figura 12. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador do Interferon gamma, das aves dos grupos desafiados vacinado e não vacinado, nos diferentes intervalos pós-desafio 48
Figura 13. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador da Interleucina 1 beta, das aves dos grupos desafiados vacinado e não vacinado, nos diferentes intervalos pós-desafio 49
Figura 14. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador da Interleucina 6, das aves dos grupos desafiados vacinado e não vacinado, nos diferentes intervalos pós-desafio 49
Figura 15. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador da Interleucina 10, das aves dos grupos desafiados vacinado e não vacinado, nos diferentes intervalos pós-desafio 50
Figura 16. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador do Fator de necrose tumoral, das aves dos grupos desafiados vacinado e não vacinado, nos diferentes intervalos pós-desafio 50
Figura 17. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador do Fator de transformação de crescimento, das aves dos grupos desafiados vacinado e não vacinado, nos diferentes intervalos pós-desafio 51
Figura 18. Número de cópias do gene S1 do VBI (Log_{10}) detectados nas aves dos grupos vacinado e desafiado, e não vacinado e desafiado, nos diferentes intervalos pós-desafio 52
Figura 19. Comparação de escores totais de ciliostase na traquéia das aves dos grupos vacinado e desafiado, e não vacinado e desafiado, nos diferentes intervalos pós-desafio 54
Figura 20. Comparação entre os resultados de escores da histopatologia das aves dos grupos vacinado e não vacinado, nos diferentes intervalos pós-desafio 55

Figura 21. Fotomicrografia de traquéia da galinha do grupo controle negativo, aos 21 dias de idade. HE, obj. 10x..... 56
Figura 22. Fotomicrografia de traquéia de galinha do grupo controle negativo, aos 21 dias de idade. HE, obj. 20x..... 56
Figura 23. Fotomicrografia de traquéia de galinha do grupo controle positivo (somente desafiada) no sétimo dia pós-infecção. HE, obj. 10x – Escore 1 de infiltrado inflamatório 57
Figura 24. Fotomicrografia de traquéia de galinha do grupo não vacinado e desafiado, no terceiro dia pós-infecção. HE, obj. 10x – Escore 2 de infiltrado inflamatório..... 57
Figura 25. Fotomicrografia de traquéia de galinha do grupo não vacinado e desafiado, no terceiro dia pós-infecção. HE, obj. 10x – Escore 3 de infiltrado inflamatório. 58
Figura 26. Fotomicrografia de traquéia de galinha do grupo não vacinado e desafiado no sétimo dia pós-infecção. HE, obj. 20x - Hiperplasia epitelial de escore 3. 58
Figura 27. Fotomicrografia de traquéia de ave do grupo vacinado no primeiro dia de idade, e desafiado com o VBI aos 21 dias de idade no terceiro dia pós-infecção. HE, obj. 10x. - Inflamação na túnica adventícia de escore 3..... 59
Figura 28. Perfil cinético da produção de anticorpos do isótipo IgG anti-VBI detectados pelo S-ELISA-ConA nas amostras de soro das aves do Delineamento experimental II, nos diferentes intervalos pós-vacinação ou pós-infecção 63
Figura 29. Comparação entre os níveis de anticorpos do isótipo IgG nas amostras de soro das aves do Delineamento experimental II aos 29 dias de idade..... 63
Figura 30. Comparação entre os níveis de anticorpos do isótipo IgG nas amostras de soro das aves do Delineamento experimental II aos 29 dias de idade..... 64
Figura 31. Perfil cinético da produção de anticorpos do isótipo IgG anti-VBI detectados pelo S-ELISA-ConA nas amostras de lágrima das aves do Delineamento experimental II, nos diferentes intervalos pós-vacinação ou pós-infecção 64
Figura 32. Comparação entre os níveis de anticorpos do isótipo IgG nas amostras de lágrima das aves do Delineamento experimental II aos 29 dias de idade..... 65
Figura 33. Comparação entre os níveis de anticorpos do isótipo IgG nas amostras de lágrima das aves do Delineamento experimental II aos 29 dias de idade..... 65

Figura 34. Perfil cinético da produção de anticorpos do isótipo IgM anti-VBI detectados pelo S-ELISA-ConA nas amostras de soro das aves do Delineamento experimental II, nos diferentes intervalos pós-vacinação ou pós-infecção 66
Figura 35. Comparação entre os níveis de anticorpos do isótipo IgM nas amostras de soro das aves do Delineamento experimental II aos 14 dias de idade..... 66
Figura 36. Perfil cinético da produção de anticorpos do isótipo IgM anti-VBI detectados pelo S-ELISA-ConA nas amostras de lágrima das aves do Delineamento experimental II, nos diferentes intervalos pós-vacinação ou pós-infecção 67
Figura 37. Perfil cinético da produção de anticorpos do isótipo IgA anti-VBI detectados pelo S-ELISA-ConA nas amostras de soro das aves do Delineamento experimental II, nos diferentes intervalos pós-vacinação ou pós-infecção 67
Figura 38. Perfil cinético da produção de anticorpos do isótipo IgA anti-VBI detectados pelo S-ELISA-ConA nas amostras de lágrima das aves do Delineamento experimental II, nos diferentes intervalos pós-vacinação ou pós-infecção 68
Figura 39. Comparação entre os níveis de anticorpos do isótipo IgA nas amostras de lágrima das aves do Delineamento experimental II aos 28 dias de idade..... 68
Figura 40. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador do marcador de linfócito T citotóxico CD8+, das aves dos grupos vacinados com: Dose cheia, ½ dose, ¼ dose; e do grupo infectado e não vacinado, nos diferentes intervalos pós-desafio..... 70
Figura 41. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador da Granzima homóloga A, das aves dos grupos vacinados com: Dose cheia, ½ dose, ¼ dose; e do grupo infectado e não vacinado, nos diferentes intervalos pós-desafio..... 71
Figura 42. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador do Interferon gamma, das aves dos grupos vacinados com: Dose cheia, ½ dose, ¼ dose; e do grupo infectado e não vacinado, nos diferentes intervalos pós-desafio 71
Figura 43. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador da Interleucina 1 beta, das aves dos grupos vacinados com: Dose cheia, ½ dose, ¼ dose; e do grupo infectado e não vacinado, nos diferentes intervalos pós-desafio 72

Figura 44. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador da Interleucina 6, das aves dos grupos vacinados com: Dose cheia, ½ dose, ¼ dose; e do grupo infectado e não vacinado, nos diferentes intervalos pós-desafio 72
Figura 45. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador da Interleucina 10, das aves dos grupos vacinados com: Dose cheia, ½ dose, ¼ dose; e do grupo infectado e não vacinado, nos diferentes intervalos pós-desafio 73
Figura 46. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador do Fator de necrose tumoral, das aves dos grupos vacinados com: Dose cheia, ½ dose, ¼ dose; e do grupo infectado e não vacinado, nos diferentes intervalos pós-desafio..... 73
Figura 47. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador do Fator de crescimento de transformação, das aves dos grupos vacinados com: Dose cheia, ½ dose, ¼ dose; e do grupo infectado e não vacinado, nos diferentes intervalos pós-desafio..... 74
Figura 48. Número de cópias do gene S1 do VBI (Log_{10}) detectados nas aves dos grupos desafiados: vacinado com dose cheia, vacinado com ½ dose, vacinado com ¼ da dose; e infectado e não vacinado, nos diferentes intervalos de 24 h e 5 d pós-desafio..... 75
Figura 49. Comparação de escores totais de ciliostase na traquéia, no intervalo de 5 dpi das aves de cada um dos grupos experimentais do Delineamento Experimental II.76
Figura 50. Comparação entre os escores de histopatologia obtidos nas aves desafiadas e previamente vacinadas com diferentes doses e nas aves do grupo CP, e aves do grupo CN do Delineamento experimental II..... 77

Lista de Tabelas

Página

Tabela 1. Parâmetros de avaliação da ciliostase de anéis traqueais para a avaliação do estado de proteção ao desafio com VBI 35
Tabela 2. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na técnica de PCR em tempo real, incluindo número de acesso, comprimento dos fragmentos amplificados, temperatura de anelamento e número de ciclos. 39
Tabela 3. Avaliação do escore de inibição do movimento ciliar da traquéia de aves do Delineamento experimental I.....53
Tabela 4. Avaliação do escore de inibição do movimento ciliar da traquéia de aves do Delineamento experimental II.....76

Lista de Quadros

Página

Quadro 1. Classificação de grau de correlação de acordo com valor do coeficiente de correlação e respectivas cores relacionadas.....37
Quadro 2. Resultados referentes ao teste de correlação de Spearman entre os resultados obtidos da mensuração dos diferentes isótipos (IgA, IgG e IgM) de anticorpos anti-VBI em relação aos ensaios de avaliação da ciliostase, a magnitude das alterações histopatológicas e replicação viral, das amostras de lágrima e de soro provenientes das aves do Delineamento experimental I (intervalo de 7dpi), infectadas com o VBI, previamente vacinadas ou não. 61
Quadro 3. Resultados referentes ao teste de correlação de Spearman entre os resultados obtidos da quantificação da expressão dos genes imune-relacionados, de avaliação da ciliostase, de histopatologia e replicação viral, das amostras de traquéia provenientes das aves do Delineamento experimental I, infectadas com o VBI, previamente vacinadas ou não.....61
Quadro 4. Resultados referentes ao teste de correlação de Spearman entre os resultados obtidos de avaliação da ciliostase, de histopatologia e replicação viral, das

amostras de traquéia provenientes das aves do Delineamento experimental II, infectadas com o VBI, previamente vacinadas ou não.....80
Quadro 5. Resultados referentes ao teste de correlação de Spearman entre os resultados obtidos da mensuração dos diferentes isótipos (IgA, IgG e IgM) de anticorpos anti-VBI em relação aos ensaios de avaliação da ciliostase, a magnitude das alterações histopatológicas e replicação viral, das amostras de lágrima e de soro provenientes das aves do Delineamento experimental II (intervalo de 5dpi), infectadas com o VBI, previamente vacinadas ou não.. 80
Quadro 6. Resultados referentes ao teste de correlação de Spearman entre os resultados obtidos da quantificação da expressão dos genes de imune-resposta, a intensidade da ciliostase, a magnitude das alterações histopatológicas e replicação viral, das amostras de traquéia provenientes das aves do Delineamento experimental II (intervalo de 24hpi), infectadas com o VBI, previamente vacinadas ou não. 81
Quadro 7. Resultados referentes ao teste de correlação de Spearman entre os resultados obtidos da quantificação da expressão dos genes de imune-resposta, a intensidade da ciliostase, a magnitude das alterações histopatológicas e replicação viral, das amostras de traquéia provenientes das aves do Delineamento experimental II (intervalo de 5 dpi), infectadas com o VBI, previamente vacinadas ou não.. 82
Quadro 8. Resultados referentes ao teste de correlação de Spearman entre os resultados obtidos da quantificação da expressão dos genes de imune-resposta do intervalo de 24 hpi e intensidade da ciliostase, a magnitude das alterações histopatológicas e replicação viral do intervalo de 5 dpi, das amostras de traquéia provenientes das aves do Delineamento experimental II, infectadas com o VBI, previamente vacinadas ou não.....83

Imunidade celular e humoral no trato respiratório de galinhas desafiadas com o vírus da bronquite infecciosa e efeito de subdosagens da vacina na indução de proteção

RESUMO

As respostas imunes inatas e adquiridas, incluindo-se aí tanto as mediadas por fatores humorais como celulares normalmente induzidas após a infecção ou vacinação com o vírus da BI (VBI), são caracterizadas por sua grande complexidade e por aspectos relevantes que ainda são pouco conhecidos, no que tange aos elementos capazes de exercer uma ou mais ações efetoras contra esse patógeno e que culminassem na restrição da replicação viral, seguido de sua eliminação do organismo hospedeiro e também no impedimento de lesões mais severas. Isso posto, foi formulado o presente estudo com o fito principal de fazer a avaliação das respostas imunes humorais e celulares em diferentes intervalos pós-desafio com o VBI de aves previamente vacinadas ou não, realizando-se a mensuração de anticorpos no soro e na lágrima, e a quantificação da expressão de genes relacionados às respostas imunes na superfície traqueal, a fim de correlacionar tais parâmetros com o estado de proteção ao desafio. Os resultados demonstraram que os aumentos significativos nos níveis de anticorpos lacrimais dos isótipos IgG e IgA nas aves previamente vacinadas e também na expressão dos genes relacionados às respostas imunes, sobretudo o CD8, a Granzima A e o IFNγ foram correlacionados negativamente com um ou mais parâmetros de alterações patológicas traqueais. Constatou-se também, que a memória das respostas imunes humorais e cito-mediadas conferida por uma única vacinação contra a BI no primeiro dia de idade é dependente da dose vacinal administrada.

Palavras-chave: Bronquite infecciosa das galinhas, Citocinas, Imunidade Mucosa, PCR em tempo real, Vacina.

Local Cellular and humoral immunity in respiratory tract of chickens challenged with infectious bronchitis virus and Effect of vaccine sub-doses inducing protection

ABSTRACT

Avian infectious bronchitis virus (IB) is a worldwide infectious disease which causes significant economic losses in poultry industry. The innate and acquired immune responses, including whether there mediated by both cellular and humoral factors that are induced after infection or vaccination with IB virus (IBV) are characterized by their higher complexity and for the relevant aspects that are still poorly known, with respect to the elements able to exercise one or more actions against the pathogen and that culminate in the restriction of its propagation and also on your clearance of the host organism. So, this project was formulated with the main done to make the evaluation of cellular and humoral immune responses at different intervals post-immunization or post-challenge with IBV poultry previously vaccinated or not, performing the measurement of antibodies in serum or tears and quantitation of the expression of genes related to immune responses in tracheal surface, correlating these parameters with the protection against IBV. The results showed that both significative increase of IgG and IgA isotypes in tears of previously vaccinated chickens and the expression levels of genes related to immune responses, especially CD8, Granzyme A and IFN γ were negatively correlated with one or more parameters of pathological lesions at trachea. Moreover, we found that the immune memory conferred by vaccination against BI on the first day of age is dependent on vaccine dose administered.

Key-words: Avian infectious bronchitis virus, Cytokines, Mucosal immunity, Real time PCR, Vaccine.

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira encontra-se em posição de destaque no cenário mundial, é a maior exportadora de carnes de frango e a terceira maior produtora de frangos de corte. Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), a avicultura mundial produziu 71,715 milhões de toneladas em 2009, ou seja, 0,39% a mais que em 2008, sendo o Brasil responsável por 10,980 milhões de toneladas. O avanço na produção de ovos é outro fator relevante e atende a toda demanda no mercador interno, com potencial para mercado externo (UBA, 2009).

No entanto, as doenças respiratórias virais em avicultura ainda exercem um impacto significativo em perdas econômicas no mundo todo, relacionados à diminuição do crescimento, diminuição da qualidade e da produção de ovos, mortalidade, condenação no abate e gastos com insumos incluindo diagnóstico, vacinas e antimicrobianos a fim de eliminar infecções bacterianas intercorrentes. Dentre os agentes com grande potencial em ocasionar as mais severas perdas em termos de mortalidade estão as estirpes de alta virulência do vírus da doença de Newcastle (NDV) e do vírus da influenza aviária (AIV). Além dessas, três outras doenças respiratórias virais também possuem significativa importância em termos de severidade de lesões produzidas, tal como a laringotraqueíte infecciosa (ILT), a síndrome da cabeça inchada por metapneumovírus aviário (aMPV) e a bronquite infecciosa das galinhas (BI), sendo que todas estas enfermidades virais podem ser prevenidas através da utilização de vacinas adequadas. Dentre as três últimas doenças, a BI possui maior importância econômica, em razão de sua ampla disseminação, e dos enormes prejuízos que acarreta, que são da ordem de milhões de dólares anualmente (JONES, 2010).

O vírus da BI (VBI) ocasiona uma doença aguda do trato respiratório das galinhas. A doença pode ser prevenida pela vacinação com estirpes atenuadas quando

administradas via óculo-nasal, mas não quando administrada sistemicamente, sugerindo-se que a imunidade mucosa é essencial para proteção, e seu desenvolvimento requer a interação direta da superfície mucosa com o VBI. Estudos preliminares demonstraram que os linfócitos T citotóxicos desempenham um papel fundamental no "clearance" inicial do vírus e a IgA é crucial na proteção contra re-infecções. Entretanto, os mecanismos envolvidos na imunidade local mucosa permanecem muito pouco definidos

O objetivo principal deste trabalho foi primeiramente desenvolver e validar ferramentas de avaliação das respostas imunes humoral e celular na mucosa do trato respiratório e anexos, tendo em vista que poucos estudos dentro desse assunto foram desenvolvidos até o momento, e que há muitos aspectos importantes para serem elucidados. Em segundo lugar, procurou-se correlacionar os parâmetros da imunidade humoral e da imunidade cito-mediada detectados no trato respiratório e anexos com o estado de proteção ao desafio pelo VBI, mensurado por alterações patológicas traqueais induzidas por este vírus. O modelo viral selecionado foi o vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBI), cuja porta de entrada e local principal de replicação é a mucosa do trato respiratório superior, todavia, essa ferramenta desenvolvida poderá ser aplicada à investigação de inúmeros agentes etiológicos que provocam alterações patológicas similares nas aves.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bronquite Infecciosa das galinhas

A Bronquite Infecciosa das galinhas (BI) foi descrita pela primeira vez em Dakota do Norte, Estados Unidos, em 1930, e no Brasil, em 1957. A doença ocorre em praticamente todas as regiões do mundo onde existe a avicultura industrial, e, no Brasil, tem ocorrido com grande freqüência na Serra Gaúcha, Oeste de Santa Catarina, Sudoeste, Oeste e Norte do Paraná, além do Sul e Norte de São Paulo e Triângulo Mineiro (ASSAYAG, 2004; CAPUA et al., 1999; CAVANAGH & NAQI, 2003; DI FÁBIO & ROSSINI, 2000; HIPÓLITO et al., 1973).

2.1.1 Etiologia

Na atualidade, as coronaviroses são classificadas, taxonomicamente, em quatro grupos diferentes, com os grupos 1 e 2 consistindo de várias coronaviroses de mamíferos, o grupo 3 formado exclusivamente de coronaviroses aviárias, tais como VBI, coronavírus de perus (TCoV) e coronavírus de faisão, e o grupo 4 contendo somente o coronavírus humano recentemente descoberto causador da SARS (SARS-CoV) (ARIAANS et al., 2008).

A BI tem como agente etiológico um RNAvírus, que pertence à família *Coronaviridae* e ao gênero *Coronavirus*, e pode ser definida como sendo uma doença viral altamente contagiosa e de curto período de incubação, que acomete aves da espécie *Gallus gallus*, causando uma doença com sinais clínicos e lesões predominantemente do trato respiratório, caracterizados principalmente por espirros e estertores tráqueo-bronquiolares, conjuntivite, sinusite e, às vezes, na dependência especialmente da virulência e do patotipo da estirpe do VBI envolvida, podem surgir

alterações patológicas de nefrite, nefrose, epididimite e ovário-salpingite (CAVANAGH, 2007).

Hoje a BI está incluída na lista da OIE (Organização Mundial de Saúde Animal) 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 (OIE, 2008).

O genoma deste vírus é composto por RNA de fita simples, não segmentado, com sentido positivo e 27,6 Kilobases (Kb) de comprimento (BOURSNELL et al., 1987). Três diferentes genes são responsáveis por codificar suas principais proteínas estruturais, que são a glicoproteína de superfície (S), a glicoproteína da matriz (M) e a proteína do nucleocapsídeo (N) (CALLISON et al., 2006; CAVANAGH, 1981; LAI & CAVANAGH, 1997; SIDDEL et al., 1982; 1983; STERN & KENNEDY, 1980; STERN & SEFTON, 1982; STURMAN et al., 1980; STURMAN & HOLMES, 1983).

A glicoproteína S constitui a principal proteína estrutural do VBI, que está presente como um conjunto de projeções no envoltório externo viral, formando uma coroa proeminente, e é composta das subunidades S1, com 520 aminoácidos, e S2, com 625 aminoácidos (CAVANAGH & NAQI, 2003). O gene codificador da glicoproteína S é muito diversificado em termos de sua seqüência de nucleotídeos e, por conseguinte, na estrutura primária da proteína que ele codifica, especialmente na parte S1 (CAVANAGH, 1995). As mutações no gene da glicoproteína S determinam o surgimento de novas variantes e até mesmo sorotipos desse mesmo vírus, sendo que a diferenciação das estirpes do VBI fundamenta-se na identificação da região variável do gene ou da proteína S, no que concerne tanto à caracterização genética como antigênica das diferentes estirpes do VBI.

Há também evidências de que ocorre recombinação natural entre os genomas de diferentes estirpes do VBI (JIA et al., 1995; KUSTERS et al., 1990; WANG, et al., 1993). Dessa forma, como conseqüência de mutações e de recombinações gênicas, aparecem mais variações genéticas que se refletem em alterações fenotípicas, antigênicas ou biológicas, encontradas entre as diversas estirpes do VBI.

Ainda, sabe-se que os sítios antigênicos mais importantes, isto é, aqueles que estão associados à indução de anticorpos neutralizantes, encontram-se situados, na sua maior parte, no polipeptídeo S1 (KANT et al., 1992). Tais sítios antigênicos são essenciais para o desenvolvimento da proteção específica imune (IGNJATOVIC & GALLI, 1994). Experimentos de vacinação e desafio sugerem que o grau de proteção cruzada entre as estirpes do VBI diminui à medida em que as diferenças entre as seqüências de S1 aumentam (CAVANAGH & NAQI, 2003).

As proteínas M e N contém epítopos conservados, os quais constituem antígenos grupo específico. Somente cerca de 10% da glicoproteína M é exposta na superfície externa do vírus. A proteína N está situada em torno da fita única do genoma do VBI (CAVANAGH & NAQI, 2003).

O VBI se replica no citoplasma da célula hospedeira, seis RNAms são produzidos pelo mecanismo de transcrição descontínuo, que pode gerar recombinações. A formação do virion ocorre pelo processo de brotamento na membrana do retículo endoplasmático, e não na superfície celular. Embora a proteína S tenha a capacidade de migrar através do retículo para a superfície celular, a proteína M não pode. Os virions se acumulam em vesículas, mas o mecanismo de liberação a partir da célula é desconhecido. Novas partículas virais começam a aparecer cerca de três a quatro horas após a infecção (CAVANAGH & NAQI, 2003).

A ligação do VBI à superfície da célula do hospedeiro é realizada entre a glicoproteína de superfície viral S e o ácido siálico, que serve como receptor na célula hospedeira; essa interação foi demonstrada pela desialização a partir do tratamento de cultura de órgão traqueal com neuraminidase, que acarretou no retardamento do efeito sobre a estase ciliar ou indução de apenas perda parcial da atividade ciliar (WINTER et al., 2008).

2.1.2 Patogenia da Infecção pelo VBI

A BI ocorre sob formas clínicas e anatomopatológicas diferentes. Quando são acometidas aves durante as primeiras semanas de vida, são mais comumente observados os sintomas respiratórios caracterizados por espirros, estertores úmidos da traquéia, com elevadas morbidade e mortalidade. Nas poedeiras e reprodutoras, a enfermidade ocasiona queda de postura (5% a 30%) e/ou produção de ovos defeituosos (casca mole, rugosa, despigmentada), sem, entretanto, haver uma mortalidade significativa. Nos frangos de corte, a doença pode ocorrer sob a forma de nefrite-nefrose, havendo aumento acentuado dos rins, diarréia aquosa e morbidade e mortalidade variáveis (5% a 20%). 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%). Ainda, há evidências de que a BI possa estar associada a quadros de enterite e de infertilidade em machos (CAVANAGH & NAQI, 2003; DI FÁBIO & ROSSINI, 2000; JONES, 2010; SILVA, 1989).

Foi descrito por YU et al. (2001) a associação do VBI com doença no proventrículo. Vacinas e isolados de campo do VBI podem persistir em tonsilas cecais e no trato intestinal, sendo nesse caso, excretadas juntamente com as fezes durante semanas (OIE, 2008).

A patogenia do VBI é variável, em termos de tropismo tecidual, mas no geral, é bastante frequente o acometimento, em maior ou menor grau, do trato respiratório. Contudo, na dependência da estirpe viral, espécie e idade das aves e condições ambientais, o indivíduo acometido pode não apresentar lesões e sinais clínicos respiratórios. Assim, a patogenia da infecção pelo VBI se caracteriza, no geral, por uma viremia, depois de haver a invasão e infecção inicial no epitélio traqueal, o que contribui para a maior disseminação desse vírus para os órgãos viscerais, onde esse patógeno pode ou não persistir e produzir lesões. A transmissão, por seu turno, ocorre através do contato direto ou indireto entre a ave doente ou mesmo infectada e assintomática e as aves sadias, sendo nessas aves 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 o vírus pode causar uma mortalidade significativa (CAVANAGH & NAQI, 2003; DI FÁBIO, 1993; DI FÁBIO & ROSSINI, 2000).

Quanto à avaliação histológica dos efeitos da infecção pelo VBI, no trato respiratório o que se nota é a diminuição do número de cílios nas células epiteliais da traquéia, a descamação desse mesmo epitélio, a presença de infiltrado de células inflamatórias e a formação de edema na porção da mucosa e submucosa, que ocorrem no intervalo de 24 a 120 horas após a infecção, juntamente com a detecção do antígeno viral no citoplasma das células (pico aos quatro dias pós-infecção); e, nos intervalos subseqüentes, costuma ocorrer hiperplasia das células basais e regeneração do epitélio traqueal, seguidos pela infiltração massiva de linfócitos na lâmina própria. Nesse processo inflamatório, são iniciadas e ativadas as respostas imunes humoral e celular que se destinam, essencialmente, à eliminação do VBI do meio interno do hospedeiro (CAVANAGH & NAQI; 2003; DI FÁBIO; 2000; KOTANI et al., 2000).

Essa enfermidade, quando acomete matrizes pesadas, pode induzir o desenvolvimento de quadros de necrose do músculo peitoral profundo a partir da 28ª semana de idade, provocando quedas de produção significativas, e um baixo número de pintinhos produzidos por ave alojada, sendo encontrados casos com queda na densidade de ovos, aumentando o número de ovos trincados e quebrados, além de albúmen liquefeito e diminuição da qualidade das aves neonatas oriundas destes ovos (ASSAYAG, 2004).

Além disso, em matrizes pesadas e aves de postura comercial, tem sido observado um aumento significativo dos problemas de “cabeça inchada”, peritonites e salpingites resultantes de infecções secundárias à bronquite infecciosa, e, em alguns casos, precipitadas por uma maior susceptibilidade aos quadros de enterite. Todos estes casos descritos acarretam um aumento relevante no consumo de antibióticos, incrementando 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 bronquite infecciosa das galinhas 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; JONES, 2010). Com relação a isso, ARIAANS et al. (2008) concluíram que tanto a estirpe virulenta como a vacinal do VBI contribuem para o agravamento de infecções secundárias por *E. coli*, nas quais um papel relevante do VBI parece ser atuar no sentido de alterar os padrões de expressão gênica de citocinas sistemicamente, de forma a desregular as respostas imunes e favorecer a instalação de infecções por *E. coli*.

2.1.3 Vacinação contra o VBI

O controle da BI está principalmente fundamentado na vacinação das aves criadas em regiões endêmicas, a qual é via de regra feita por meio de formulações contendo suspensões atenuadas do VBI, cujas vias de administração mais empregadas são instilação nasal ou ocular, ou ainda por aerossol. Vários estudos foram realizados na tentativa de se definir quais mecanismos de imunidade são, de fato, mais relevantes para conferir proteção contra a infecção por este vírus. Assim, o conjunto de resultados obtidos nesses diversos estudos colocaram em evidência que os mecanismos de imunidade humoral e celular que são ativados ou produzidos junto à mucosa do trato respiratório parecem ser essenciais para a restrição da atividade de replicação viral, de sorte a contribuir para a eliminação deste patógeno, bem como para a resolução do processo infeccioso, sendo que a interação direta de elementos celulares e moleculares do sistema imune que estão presentes na superfície mucosa do trato respiratório com esse vírus pode ser imprescindível para o desenvolvimento de um estado efetivo de imunidade protetora (WANG et al., 2006).

ANDRADE et al. (1982) verificaram proteção induzida pela vacina contra a infecção pelo VBI frente ao desafio realizado três semanas após a vacinação, baseando-se nos resultados de isolamento viral em ovos embrionados em conjunto com avaliação da integridade do movimento ciliar e histopatologia na traquéia. DARBYSHIRE (1985) observaram resultados semelhantes.

No Brasil, o controle da BI é principalmente baseado no uso de vacinas atenuadas, sendo somente permitido a utilização de estirpes do sorotipo Massachussetts (Mass) na formulação de tais vacinas (VILLARREAL et al., 2010). Para

tanto, têm sido mais frequentemente utilizadas as estirpes H120 e H52 ou Ma5 do VBI, sendo que o número das duas primeiras representa o número de passagens às quais essas cepas foram submetidas para chegar ao seu nível específico de atenuação. Assim, a vacina H120 é mais atenuada do que a H52.

Dentro desse escopo, sabe-se que os mecanismos essenciais de proteção contra a infecção do trato respiratório pelo VBI em galinha têm sido definidos como a capacidade de o sistema imune conferir resistência à traquéia contra a infecção por este vírus, reduzindo a replicação viral e impedindo principalmente que ocorram lesões mais severas na traquéia e a completa ciliostase no epitélio desse mesmo órgão. No entanto, há muitas controvérsias sobre o papel efetivo exercido pelos processos de imunidade inata e, sobretudo, pelas respostas imunes adquiridas, tanto a humoral como a celular, prevalecendo correntes de pesquisadores que defendem a importância maior de um tipo de resposta imune em detrimento da outra.

A despeito da existência de inúmeros trabalhos na literatura versando sobre a imunidade contra o VBI, especialmente aquela que é decorrente do uso de vacinas, restam muitas dúvidas sobre a exata função e a relevância dos mecanismos de imunidade específica que são estimulados pela vacinação contra a BI e capacitam o organismo hospedeiro a desenvolver um estado de proteção eficiente contra a infecção produzida por este vírus.

2.2 O Sistema imune de galinhas

2.2.1. Noções gerais

A respeito do sistema imunológico das aves, a diferença com as outras espécies é muito clara pela precocidade na formação e maturação do sistema imune, uma vez que as células da resposta adaptativa são oriundas de órgãos primários, como o timo e a bursa. A receptividade do timo embrionário, por volta dos seis dias de incubação, e da bursa, por volta dos dez, permite a formação destes linfócitos, que na vida embrionária são morfologicamente iguais aos das aves pós nascimento, mas que ainda têm funcionalidade limitada (CARON, 2008).

A chegada de células-tronco na bursa de Fabricius ocorre entre 8 e 14 dias de desenvolvimento embrionário (DE), a proliferação dessas células se inicia aos 12 dias DE e continua por várias semanas após a eclosão, enquanto a emigração das células maduras começa aos 18 dias DE (SCOTT, 2004).

É amplamente conhecido, em termos citológicos e funcionais, que o sistema imune das aves se divide em dois segmentos básicos: imunidade humoral e imunidade celular; as duas são mediadas diretamente pelos linfócitos B e T, respectivamente, sendo que neste último caso, atuam populações de linfócitos, os T citotóxicos (CD8+) e os T auxiliares (Th-CD4+), que por sua vez se subdividem em duas subpopulações de células T auxiliares: Th1 e Th2. Ainda, foi verificado que tais subpopulações de linfócitos T auxiliares são distinguidas em função do perfil de citocinas por eles sintetizadas e secretadas. Ainda, deve ser considerado que a resposta imune humoral contra patógenos virais é caracterizada principalmente pela participação de anticorpos, sobretudo aqueles com atividade vírus-neutralizante e que podem pertencer a um dos três isótipos de imunoglobulinas classificados como IgG (nas aves chamado de IgY - de gema: “yolk”), IgM e IgA, que são secretadas por plasmócitos derivados de linfócitos B estimulados após contato e reconhecimento de antígenos, T-dependentes ou T-independentes, com ou sem, respectivamente, a participação de células T auxiliares (Th-CD4+). Já, a resposta imune celular é caracterizada pela participação de linfócitos T citotóxicos (Tc-CD8+) e T secretores de citocinas pró-inflamatórias (Th1 ou T de hipersensibilidade tardia - Th1-CD4+), que se desenvolvem após estímulo antigênico sobre linfócitos Th-CD4+ (CHAMIZO et al., 2001; MONTASSIER, 2000).

2.2.2 Respostas imunes humorais em aves

Assim como em outras espécies, os primeiros sítios de desafio antigênico nas aves são as mucosas, especialmente as do trato digestório e respiratório. Esses sítios possuem tecidos linfóides especiais associados a mucosas, denominados GALT (“Gut Associated Lymphoyd Tissues”) e BALT (“Broncchio Associated Lymphoid Tissues”), nos quais são geradas as respostas imunes humorais e celulares para a proteção das superfícies mucosas, em especial a produção de anticorpos do isótipo IgA. Em nível

sérico, a ave ainda apresenta os anticorpos do isótipo IgM, que é o primeiro isótipo de anticorpo a aparecer após um estímulo antigênico. Os anticorpos do isótipo IgG aparecem posteriormente e são mais específicos, e esta maior especificidade dos anticorpos IgG depende da interação do linfócito B com linfócitos Th-CD4+, que atuam no sentido de promover uma maturação da afinidade de tais anticorpos, sendo que esse tipo de interação entre linfócitos B e Th-CD4+ é também verificada com a produção de anticorpos com maior especificidade do isótipo IgA. Na verdade, essas interações entre linfócitos B e T promovem alterações genômicas no linfócito B, que permitem o surgimento da IgG ou da IgA, e também a formação de células B de memória para a produção de anticorpos mais específicos dos isótipos IgG e IgA, como resultado da vacinação; isso permite que sejam geradas, nas próximas exposições ao mesmo antígeno, respostas com maior nível e maior afinidade de anticorpos. Além disso, deve-se destacar que uma ave produz, em média, 100mg/kg peso/dia de IgA, comparada a 30mg/kg peso/dia de IgG, o que denota a importância da vacinação via mucosa para patógenos cuja porta de entrada é por meio desse tipo de epitélio. Nas aves esta prática de imunização é muito comum por questões logísticas, afinal há uma maior facilidade na administração de vacinas por vias locais (mucosas) do que por vias parenterais que requerem a injeção de vacinas individualmente. Ademais, as vacinas "vivas" atenuadas, isto é, com atividade replicadora, são fundamentais para que os tecidos linfóides associados às mucosas sejam mais efetivamente estimulados. Alternativamente, há de se considerar a maior segurança proporcionada pelas vacinas inativadas, que conferem uma vantagem relevante, em detrimento à sua pobre resposta mediada por células T-CD8+, já que em algumas circunstâncias pode ser mais importante garantir uma maior transferência de anticorpos maternos à progênie do que estimular as respostas mediadas por células T-CD8+, uma vez que as vacinas inativadas tendem a gerar maiores títulos de anticorpos do que as vacinas "vivas" atenuadas (CARON, 2008).

A resposta imune humoral de aves frente à vacinação contra o VBI tem sido amplamente estudada e, na maioria das vezes, através da mensuração dos níveis de anticorpos no soro sanguíneo, com o uso de técnicas de ELISA, VN ou HI, cujas

magnitudes, via de regra, apresentam pouca correlação com o estado de proteção à infecção pelo VBI. Entretanto, existem poucos estudos descritos referentes à mensuração de anticorpos contra o VBI nas superfícies mucosas, incluindo secreções lacrimais e traqueo-brônquicas, e os dados obtidos não permitem um consenso sobre a relevância ou não desses anticorpos locais nos mecanismos de proteção contra o VBI (CAVANAGH, 2007).

TORO et al. (1997) avaliaram os efeitos relacionados às diferentes dosagens de vacina administrada; foi concluído que a dose de $10^{6,0}$ DIE_{50} da vacina, quando administrada aos 24 dias de idade, induziu produção de IgG no soro e de IgA na lágrima, enquanto a dose $10^{4,0}$ DIE_{50} induziu somente a produção local de IgA, e a dose de $10^{2,0}$ DIE_{50} não induziu a produção de anticorpos detectáveis, seja no soro ou na lágrima. Nesse mesmo experimento foram testadas diferentes vias de inoculação da vacina (instilação ocular, água de beber e via clocal), sendo que todas as vias induziram resposta imune humoral, e embora maiores títulos de anticorpos anti-virais tenham sido obtidos em aves vacinadas via ocular, as diferenças não foram estatisticamente significativas.

De qualquer sorte, considera-se que o mecanismo de indução da resposta imune e de proteção contra o VBI é bastante complexo, e ainda pouco conhecido. Níveis de anticorpos séricos vírus-neutralizantes, geralmente, não apresentam correlação com o estado de proteção, exceto o fato de que anticorpos do isótipo IgA nas secreções mucosas demonstraram sua importância na proteção contra re-infecções pelo VBI. Há, ainda, fortes evidências de que a atividade vírus-neutralizante de anticorpos anti-VBI mensurada “in vitro” difere daquela que ocorre nos estudos de proteção cruzada “in vivo”, embora persista a suspeita de que os anticorpos produzidos nas superfícies mucosas exerçam um papel relevante na proteção do trato respiratório contra este vírus (CAVANAGH, 2007; ITO et al., 2006; WANG et. al., 2006).

2.2.3 Respostas imunes celulares em aves

Já é conhecido que a infecção por patógenos virais (vírus da influenza aviária, vírus da doença de Marek, vírus da doença de Gumboro e VBI) é capaz de induzir uma

diversidade de mecanismos efetores tanto vinculados à resposta imune inata, como à resposta imune adaptativa, que ocorrem nas mucosas do trato respiratório, durante o estágio inicial da infecção por esses vírus; tais mecanismos são diretamente responsáveis pela rápida eliminação do vírus ao nível dos tecidos infectados (DEGEN et al., 2005; ELDAGHAYES et al., 2006; SARSON et al., 2006; WANG et al., 2006).

Na imunidade inata deve-se destacar também que a replicação viral estimula as células infectadas a produzirem interferons do tipo I (IFNα e IFNβ). Esses IFNs atuam inibindo, ao menos parcialmente, a replicação viral em células infectadas e nas células vizinhas livres de infecção. Células NK ("natural killer") também exercem ações contra a infecção viral, destruindo células infectadas por vírus, e, também, produzindo IFNs, o que se constitui em importante mecanismo de imunidade contra vírus no início do processo infeccioso e anteriormente ao desenvolvimento das respostas imunes adaptativas (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

Com relação ao papel de IFN do tipo I na infecção pelo VBI, foi verificado que após a infecção de aves com esse vírus, detectou-se uma produção aumentada de IFN I na traquéia e nos pulmões, e, em menores quantidades, no plasma, rins, fígado e baço dessas aves. Além disso, o IFN I de galinhas atuou no sentido de reduzir a replicação do VBI em culturas de células de rim e de traquéia. Ademais, a administração intravenosa ou oral do IFN I retardou o início da doença em galinhas e também diminuiu a sua severidade. No entanto, muito ainda deve ser estudado com relação à elucidação dos papéis efetivamente exercidos pelas respostas imunes inata e adaptativa, por meio dos seus principais elementos efetores, tanto humorais como celulares, frente ao VBI (CAVANAGH, 2007; COLLISON et al., 2000; PEI et al., 2001; WANG et. al., 2006).

Além da ação dos IFN I, a síntese e a secreção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNFα), a IL1 e a IL6, representam um dos primeiros eventos que compõem o conjunto de reações mais imediatas do hospedeiro contra a presença de diversos tipos de agentes infecciosos, inclusive os vírus. A ação combinada dessas citocinas causa febre, leucocitose, produção de proteínas de fase aguda e reações inflamatórias agudas, com a participação de elementos humorais e

celulares e que culminam sobretudo em uma maior atividade fagocítica, ou inclusive, em uma maior estimulação para a apresentação de antígenos e indução de respostas imunes cito-mediadas e humorais (DEGEN et al., 2005).

Estudos a respeito 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 foi correlacionada positivamente com a resistência ao desafio com esse mesmo vírus (TIMMS & BRACEWELL, 1983). Nesse mesmo contexto, JANSE et al. (1994) mostraram que a imunidade local na traquéia parece ser mediada por células T, uma vez que células T-CD4+ e T-CD8+ foram observadas em secções de traquéia e pulmão de aves infectadas com o VBI (DHINAKAR RAJ & JONES, 1996).

Em adição a isso, as respostas mediadas por linfócitos T citotóxicos em aves frente à infecção com o VBI foram relacionadas com o início da diminuição dos sinais clínicos e da atividade replicadora desse vírus. A par disso, foi verificado que a atividade das células T citotóxicas requer a compatibilidade de moléculas do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) de classe I da célula alvo do processo de citólise com o das células responsáveis por esta atividade, no caso, as células T CD8+/CD4-. Nesse contexto, foi verificado em experimentos com linhagens isogênicas de galinhas que a transferência adotiva de células T-CD8+, colhidas de aves convalescendo de infecção prévia com o VBI, foi eficaz em conferir proteção a aves não imunes frente ao desafio com esse mesmo vírus (COLLISSON et al., 2000).

No curso das infecções virais, foi verificado que componentes dos grânulos de linfócitos T citotóxicos como a Granzima A, a Granzima B e as perforinas, que também podem ser encontrados nos grânulos das células NK, atuam na destruição de células alvo infectadas por vírus. A destruição das células alvo decorre da atividade das perforinas e também da ação das granzimas. No momento em que a integridade da membrana celular é rompida pela ação das perforinas, as granzimas ativam uma via de apoptose e passam a degradar as proteínas nucleares e o próprio DNA da célula hospedeira (GÖBEL et al., 2001). Foi relatado, também, que a Granzima A é um importante elemento efetor de células NK, e principalmente, de linfócitos T citotóxicos

(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 fase inicial de infecção por esse vírus, está relacionada às células NK e com as atividades de linfócitos T citotóxicos, os quais atuam para eliminar as células infectadas com esse vírus (SARSON et al., 2006).

Deve-se considerar também que durante as respostas cito-mediadas inatas e principalmente adquiridas são produzidas citocinas, que exercem um papel importante na regulação do sistema imune e na habilidade final de proteção contra diferentes patógenos. Citocinas são importantes mediadores e reguladores das respostas imunes inatas e adaptativas dos hospedeiros, cuja função geral é orquestrar as atividades funcionais das células do sistema imune, atuando desde o início das respostas aos agentes infecciosos como fatores pró-inflamatórios, como sinalizadores e reguladores das respostas imunes humorais e cito-mediadas e, no final, como supressores da respostas imunes e das reações inflamatórias, agindo, mais nessa última fase, como indutor de reparo e cicatrização tecidual (HEIDARI et al., 2008).

No tocante às citocinas, diversos estudos têm indicado que as variações na expressão desses mediadores moleculares estão associadas ao desenvolvimento de doenças provocadas por desordens imuno-mediadas ou inflamatórias. Além disso, foi verificado que citocinas como o IFNγ, a interleucina-2 (IL2) e a IL12 são moléculas-chave tanto no desencadeamento de respostas imunes mediadas por células como na ativação de macrófagos e atuam, via de regra, no sentido de conferir um estado de proteção mais efetivo contra agentes infecciosos intra-celulares. Por outro lado, IL4, IL6 e IL13 atuam mais no sentido de inibir a imunidade mediada por células nas suas diversas formas, e, ao mesmo tempo são capazes de intensificar a produção de anticorpos de diferentes isótipos, os quais também podem participar de mecanismos de proteção específica contra o VBI, especialmente por meio da atividade vírus–neutralizante, exercida pelos anticorpos presentes nas superfícies mucosas (CHAMIZO et al., 2001).

A IL1β é produzida por uma enorme variedade de células, principalmente por fagócitos mononucleares ativados, como resposta a estímulos induzidos por

microrganismos ou seus produtos metabólicos. A atividade biológica dessa citocina é altamente pró-inflamatória, com função principal de ativar o sistema imune nas respostas de fase aguda. A IL1β ativa inúmeras outras células do organismo hospedeiro, incluindo fagócitos polimorfonucleares, macrófagos, células endotelais e linfócitos T, que podem levar à produção de outras citocinas e quimiocinas (ABBAS & LICHTMANN, 2005; WIGLEY & KAISER, 2003).

As células T auxiliares do tipo 1 (Th1), em geral, produzem predominantemente IFNγ, e são diferenciadas e ativadas pelas citocinas IL12 e IL18, estando mais associadas a estimulação de repostas citolíticas mediadas por linfócitos T CD8+/CD4-, as quais geralmente são necessárias para destruição de células infectadas por vírus ou outros microorganismos intracelulares. Por outro lado, a síntese e secreção de IL4, IL5 e IL13 por células T auxiliares do tipo 2 (Th2), previamente estimuladas por IL4 ou IL13, estão mais vinculados à produção de anticorpos, respostas imunes específicas anti-helmintos e síntese de IgE (DEGEN et al., 2005).

Ainda, no tocante ao estudo da produção de citocinas em resposta ao desafio com patógenos virais em aves, foi verificado que, em um estágio inicial da infecção pelo vírus da doença de Marek (VDM), a replicação viral era inibida por células NK e pelos macrófagos secretores de citocinas, como a IL1β e IFNγ. Ademais, foi constatado que as citocinas IFNα, IFNγ, IL1β, IL2, IL6 e IL8 também apresentaram alterações nos seus níveis de expressão após a infecção por VDM (SARSON et al., 2006). Na verdade, no estudo em apreço foi descrito um aumento na expressão de 51% dos genes testados após a infecção pelo VDM, dados estes que foram obtidos após a análise pela técnica de “microarray”, incluindo, nesse caso, os genes codificadores de citocinas ou receptores de citocinas, o que indicou que tais genes fazem parte do grupo daqueles que têm a sua expressão alterada após o estímulo e o desencadeamento das respostas de imunidade inata e de imunidade adquirida à infecção pelo VDM.

A propósito, em outro experimento, também envolvendo aves infectadas com VDM, foi detectado um incremento da expressão de IL1β e IL6, o que não ocorreu em aves não infectadas do grupo controle. Nessa mesma investigação a expressão gênica do IFNγ no baço mostrou-se mais elevada após a infecção com este vírus, embora

também tenha sido observada em aves do grupo controle uma expressão de menor intensidade do gene, enquanto que a quantificação da expressão da IL2, permaneceu inalterada mesmo após a infecção (XING & SCHAT, 2000).

A IL6, apesar de mais conhecida por seu papel na resposta inflamatória, está também envolvida na diferenciação de células B, especialmente no estado transitório de sua maturação para plasmócitos secretores de anticorpos (SCOTT, 2004).

No estudo desenvolvido por WANG et al. (2006), no qual foi utilizada a técnica de "microarrays", foi observado, após a infecção experimental de aves não imunes com a estirpe Gray do VBI, uma elevação significativa na expressão, na mucosa traqueal, de vários genes codificadores de citocinas ou de mediadores moleculares relacionados à imunidade inata e à imunidade adquirida, tendo-se destacado o incremento do gene codificador da IL1β.

ELDAGHAYES et al. (2006) descreveram a indução de respostas pró-inflamatórias em aves submetidas à infecção experimental com o vírus da doença de Gumboro, as quais foram caracterizadas por um aumento da transcrição dos genes codificadores das citocinas envolvidas na inflamação como IL1β e IL6 e também do IFNγ, que tanto pode mediar reações inflamatórias inatas como na imunidade cito-mediada.

Um aspecto interessante a considerar é que as citocinas circulantes no plasma estão presentes, via de regra, em níveis muito reduzidos, o que dificulta a investigação de seus padrões de expressão, sendo necessário a aplicação de técnicas providas de alta sensibilidade para se fazer tal tipo de avaliação (CHAMIZO et al., 2001). Ainda, no que se refere a mamíferos, incluindo humanos, encontram-se disponíveis métodos para a mensuração de citocinas no soro e em culturas celulares, como por exemplo o ELISA e o ELISPOT, os quais necessitam do uso de anticorpos monoclonais específicos para cada citocina, ou ainda, pela utilização de técnicas de bioensaios. Estes, por seu turno, são baseados em respostas celulares proliferativas a determinadas citocinas, ou em sua atividade citotóxica (FAVRE et al., 1997). Respostas imunes também podem ser analisadas em nível celular por FACScan (citometria de fluxo), por meio da detecção/mensuração de células marcadas com fluorocromos conjugados a anticorpos. A técnica de ELISPOT é baseada no mesmo princípio do

ELISA e permite a quantificação numérica de células produtoras de determinada proteína.

Até recentemente, poucas citocinas de galinhas haviam sido caracterizadas bioquimicamente e purificadas, ou produzidas como proteínas recombinantes. As primeiras citocinas a serem isoladas e caracterizadas incluem IFNγ, IL2 e o TGF. Entretanto, com o advento do projeto genoma de galinhas, um número elevado de genes codificadores de citocinas tem sido descoberto. A clonagem desses genes tem levado ao desenvolvimento de uma diversidade de reagentes para o estudo de respostas imunes aviárias inatas e adquiridas, a nível molecular e celular, o que não era possível até poucos anos atrás (HEIDARI et al., 2006).

No entanto, para aves, a detecção de citocinas em nível protéico ou antigênico ainda é problemática devido à ausência de anticorpos monoclonais específicos; ademais, deve ser considerada também a existência de poucos bioensaios aplicados na quantificação dessas citocinas (XING & SCHAT, 2000). Outrossim, a ativação do gene codificador de cada citocina pode ser monitorada através da reação de transcrição reversa (RT) seguida da reação em cadeia da polimerase (PCR). Este método é baseado na transcrição reversa do RNA mensageiro (RNAm) e na amplificação do cDNA, por PCR, em níveis detectáveis. Outros métodos como a imunoistoquímica e a PCR “in situ” são também comumente usados (FAVRE et al., 1997). Ademais, com o recente advento da metodologia de RT-PCR em tempo real, a quantificação de RNA e DNA tem sido realizada muito mais facilmente, uma vez que se trata de uma técnica provida de alta sensibilidade, especificidade e rapidez (MACKAY et al., 2002; NIESTERS, 2004).

Em suma, deve-se entender que a imunidade mediada por células contra infecções virais é composta por uma ampla gama de mecanismos incluindo a indução da atividade citotóxica por linfócitos T-CD8+, reconhecimento de antígenos-alvo em conjunto com complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e a produção de citocinas tais como IFNγ, IL2, dentre outras. As células mediadoras dessas diferentes atividades podem ser identificadas e distinguidas por antígenos de superfície, como o CD4+ para células T auxiliares, o CD8+ para células T citotóxicas e o CD3+

para células T em geral. A maioria da atividade de linfócitos T citotóxicos (CTL) vírus-específicos é restrita pela apresentação de antígenos pelo MHC I e é mediada por células T CD8+/CD4-. Com relação especificamente ao papel dos CTLs na contenção da infecção pelo VBI, foi demonstrado que essas células são capazes de lisar especificamente as células alvo derivadas do baço de galinhas infectadas com esse mesmo vírus. Além disso, foi observado que a resposta mediada pelas CTLs anti-VBI declina com aparecimento da resposta imune humoral anti-viral, especialmente os anticorpos do isótipo IgG, que foram associados como críticos para conferir habilidade de neutralização viral. Em um estágio mais avançado da infecção pelo VBI, o declínio dos títulos infectantes desse vírus, após o desafio experimental em galinhas, foi seguido por um declínio na atividade específica de CTL. Por outro lado, foi aventado que um importante papel da subpopulação de células T CD4+ em infecções virais, após reconhecer o peptídeo antigênico apresentado pelo MHC II, seria auxilar na expansão clonal e na diferenciação de células B para plasmócitos produtores de anticorpos com especificidade para antígenos do VBI, ou, alternativamente, atuar na maior estimulação de células NK e de macrófagos com atividades efetoras anti-virais, que também poderiam exercer um papel relevante na restrição contra a infecção pelo VBI (KOTANI et al., 2000).

2.2.4 Memória imunológica

Foi demonstrado em uma investigação sobre a indução de atividades das respostas imunes cito-mediadas que, em seqüência à ativação das células T, ocorre a fase de proliferação dessas células que se tornam células T-CD8+ efetoras (CTLs), que expressam atividades contra o patógeno viral exercidas principalmente por algumas citocinas (como a IL2 e o IFNγ) e também contra as células alvo infectadas, através das moléculas citolíticas, como as perforinas e granzimas. Com o “clearance” dos agentes infecciosos, há uma redução de 90 a 95% dessas células T efetoras. No entanto, uma população de células T de memória permanece nos tecidos, sendo que essas células se caracterizam por sua maior estabilidade e por possuir capacidade intensificada e mais rápida de resposta à infecção pelo mesmo patógeno. Outro aspecto interessante

desse estudo foi a observação de que as células T de memória geradas após infecção sistêmica são qualitativamente diferentes das geradas em infecções locais na mucosa, como é o caso da infecção respiratória (MUELLER et al, 2010).

Embora as respostas funcionais e mitóticas das células T à estimulação pelo antígeno persistam somente durante dias ou poucas semanas e as respostas rapidamente diminuam à medida em que o antígeno é eliminado, as células de memória sobrevivem por longos períodos, mesmo após a eliminação do antígeno. A população de células de memória é responsável pelas respostas imunes secundárias facilitadas e aceleradas às subseqüentes exposições aos mesmos antígenos. Os mecanismos de sobrevivência das células de memória não são muito bem conhecidos. Ainda não está claro se as células de memória se desenvolvem a partir das células efetoras ou se são populações divergentes que surgem de um linfócito estimulado por antígeno. As células de memória acumulam-se com a idade e tendem a se concentrar em alguns tecidos particulares, principalmente no sistema imune associado às mucosas. Os mecanismos que determinam se as células T estimuladas por antígenos irão se diferenciar em células efetoras funcionalmente ativas e de vida curta, ou funcionalmente quiescentes e com vida longa, não são bem conhecidos (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

Com respeito à memória imunológica induzida pelo VBI, COLLISON et al. (2000) observaram que a transferência de células T imunes sensibilizadas com esse vírus, em especial os linfócitos T CD8+ de memória, para galinhas isogênicas virgens de contato com o VBI, antes da infecção com esse mesmo vírus, conferiu proteção contra a infecção por estirpe nefropatogênica do VBI.

3 HIPÓTESE DE TRABALHO

As vacinas atenuadas contra o VBI, que são rotineiramente utilizadas no campo para imunização das galinhas contra a BI, induzem ambos os tipos de resposta imune local, humoral e celular, sendo que essas possuem correlação com indução do estado de proteção contra a infecção por esse vírus, via mucosa traqueal.

Portanto, a hipótese deste trabalho, baseia-se no fato de que alguns marcadores, tanto da imunidade celular local (como citocinas e marcadores de linfócitos T), assim como da imunidade humoral local (imunoglobulinas) são ativados após estímulo vacinal, e também em sequência ao desafio viral, e, que o estado de imunidade conferido pela vacinação em galinhas, irá interferir na expressão de alguns desses marcadores quando comparado a indivíduos não imunizados.

4 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Em vista de todo o exposto e, sobretudo em face da escassez de dados sobre os mecanismos efetores mais eficazes que são estimulados pela vacinação por estarem envolvidos na proteção contra a infecção pelo VBI, deve-se admitir como relevante a necessidade de estudos sobre os mecanismos mediados pela imunidade humoral e também pela imunidade celular, e o papel exercido por citocinas na patogênese e imunidade contra a BI. Ademais, deve ser considerado que, atendidas estas questões, poderiam ser propostas novas alternativas, ou para a formulação de vacinas mais eficazes, ou para um manejo imuno-profilático mais apropriado contra a infecção por esse vírus. Assim, realizou-se a presente pesquisa com o objetivo geral de avaliar a imunidade celular e humoral no trato respiratório de galinhas desafiadas com o vírus da Bronquite Infecciosa, e o efeito de subdosagens da vacina na indução de proteção. Para tanto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Determinar a expressão de genes de imune-respostas, como os genes das citocinas IL1β, IL6, IL10, TNFα, IFNγ, e TGFβ, da Granzima homóloga A e do marcador de linfócito T citotóxico CD8+, em traquéias de aves vacinadas ou não, e experimentalmente infectadas com o VBI, através da quantificação relativa utilizando-se a técnica PCR em tempo real;

- Comparar os níveis de expressão de genes relacionados à imunidade com a replicação viral, utilizando-se a técnica de quantificação absoluta por RT-PCR em tempo real;

- Correlacionar, em diferentes intervalos pós-desafio, os níveis de expressão de genes relacionados à imunidade com as intensidades de alterações patológicas na traquéia, mensuradas pelos escores de ciliostase e de lesões histológicas, nesse mesmo órgão de aves desafiadas com o VBI;

- Mensurar os isótipos IgG, IgA e IgM de anticorpos anti-VBI produzidos tanto em nível local (secreção lacrimal) como nível sistêmico (soro sanguíneo), nos períodos pré e pós-desafio com o VBI;

- Correlacionar, em diferentes intervalos pós-desafio, os níveis dos isótipos IgG, IgA e IgM de anticorpos anti-virais produzidos tanto localmente (secreção lacrimal) como sistemicamente (soro sanguíneo), com a replicação viral e com as alterações patológicas na traquéia de aves desafiadas com o VBI;

- Determinar o grau de proteção ao desafio induzido pela vacina atenuada contra o VBI administrada em pintinhos com 1 dia de idade, por meio da avaliação da replicação viral, da integridade do movimento ciliar e da intensidade das lesões traqueais, a fim de se tentar estabelecer os níveis de correlação entre as respostas imunes cito-mediadas e humorais e destas com o estado de proteção à infecção com o VBI;

- Avaliar efeito de diferentes doses vacinais e sua influência na indução de proteção frente ao desafio com o VBI.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Vírus

Para a realização da infecção experimental em aves foi utilizada a estirpe de referência M41 do VBI, pertencente ao sorotipo Massachussets, de caráter prioritariamente respiratório, obtida no Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves da EMBRAPA (Concórdia-SC).

Para a imunização das aves foi utilizada a estirpe vacinal H120 (Mass I, Fort Dodge), com título de $10^{4,3}$DIE/dose (quando diluída de acordo com as recomendações do fabricante), obtida no Departamento de controle de qualidade da Fort Dodge, Município de Paulínia-SP.

5.2 Propagação da estirpe M41 do VBI em ovos embrionados SPF

Esta técnica foi realizada com base na descrição de OWEN et al. (1991), com algumas alterações. A amostra da estirpe M41 do VBI foi inoculada em ovos embrionados "Specific Pathogen Free" (SPF) com 9 a 11 dias de incubação, sendo submetidas a três passagens sucessivas.

Foram utilizados 25 ovos, sendo 22 destinados à propagação viral e três ao controle da infecção. A inoculação foi feita na cavidade alantóide, administrando-se um volume de 200µL/ovo de suspensão de cada estirpe viral diluída a 1:100 em Meio de cultura Eagle (Gibco BRL, EUA) contendo antibióticos (200 UI/mL de Penicilina e 50 µg/mL de Estreptomicina) e antifúngico (50 UI/mL de Anfotericina B). Após 24 horas de incubação, os ovos foram avaliados, sendo considerada inespecífica a mortalidade

ocorrida neste período; e, 36 horas pós-inoculação, os ovos remanescentes foram resfriados a 4ºC e o líquido cório alantóide (LCA) colhido e estocado a –70ºC. A mortalidade embrionária dos três ovos controle foi avaliada diariamente, sendo os embriões mortos classificados como positivos ou negativos, de acordo com a presença ou ausência de lesões características do VBI (nanismo, enrolamento e/ou hemorragia) e mediante a comparação com os embriões do grupo controle negativo (dez ovos SPF inoculados apenas com Meio de cultura Eagle, o mesmo utilizado para diluição viral). Ao final do sétimo dia pós-inoculação, todos os ovos do controle da infecção foram abertos e os embriões submetidos à mesma pesquisa de lesões características descritas anteriormente (nanismo e enrolamento).

5.3 Determinação da infectividade viral

A infectividade viral da estirpe M41 do VBI foi determinada por titulação viral em ovos embrionados de galinhas SPF, com 9 a 11 dias de incubação, consoante ao método preconizado por GELB et al. (1991). Partindo-se do LCA colhido de ovos infectados com a estirpe M41 do VBI após a terceira passagem, foram preparadas diluições de razão constante igual a dez até a diluição final de 10^{-9}, 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 Anfoterricina B). As suspensões foram inoculadas na cavidade alantóide, no volume de 200 μL/ovo, sendo 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 até 24 horas; ao final de sete dias, as alterações embrionárias dos sobreviventes foram analisadas. O título foi expresso em Doses Infectantes Embrionárias 50% ($DIE_{50\%}$), calculado pelo método de REED & MUENCH (1938).

5.4 Infecção experimental em galinhas

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Imunologia e Virologia Veterinária, Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, da Universidade Estadual Paulista – FCAV-UNESP. O protocolo obedeceu os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da FCAV-UNESP, conforme o protocolo nº008552-07.

5.4.1 Delineamento experimental I: avaliação comparativa entre alterações da expressão gênica e intervalo pós-infecção

Foram utilizadas 75 aves SPF da linhagem de postura "White Leghorn", distribuídas em três grupos de 25 animais, alojados separadamente em isoladores com pressão positiva. As aves receberam água e comida à vontade durante todo o experimento. O primeiro grupo foi submetido à vacinação via aerossol (vacina comercial atenuada, na dose preconizada pelo fabricante, ou seja, $10^{4.3}$ DIE_{50}), no primeiro dia de idade. O segundo e terceiro grupos receberam somente o diluente utilizado na vacinação do primeiro grupo. Aos 21 dias de idade as aves do primeiro e segundo grupos foram desafiadas via óculo-nasal com a estirpe M41 ($10^{4.0}$ DIE_{50}). O terceiro grupo foi mantido como controle negativo da infecção, já que não foi submetido à vacinação nem ao desafio.no primeiro dia de idade. Foram colhidas amostras de soro e de lágrima nos intervalos de uma, duas e três semanas pós-vacinação, e, amostras de soro, lágrima e traquéia nos intervalos: 8 horas pós-infecção (hpi), 24hpi, 4 dias pós-infecção (dpi), 7 dpi e 15 dpi. Para cada intervalo foram sacrificadas três aves por grupo. As amostras de soro e de lágrima foram armazenadas a –20°C, até o momento de serem processadas pela técnica de ELISA, parte das amostras de traquéia foi destinada à avaliação da ciliostase (movimento ciliar da traquéia), outra parte à histopatologia, e o restante das amostras teciduais foram submetidas ao congelamento

rápido em nitrogênio líquido e armazenadas a –70°C até o momento de serem processadas pela técnica de extração de RNA.

5.4.2 Delineamento experimental II: **Avaliação comparativa entre dose vacinal e indução de proteção efetiva**

Foram utilizadas 72 aves SPF da linhagem de postura "White Leghorn", distribuídas em cinco grupos (I – dose cheia, II – ½ dose, III - ¼ dose, IV – controle positivo da infecção e V - controle negativo da infecção) compostos por 14, 15, 15, 18 e 10 animais, respectivamente, alojados em isoladores com pressão positiva, separados. As aves receberam água e comida à vontade durante todo o experimento. Os grupos I, II e III foram submetidos à vacinação via óculo-nasal (vacina comercial atenuada da estirpe H120 do VBI) nas respectivas doses de $10^{4,3}$ DIE_{50} (dose cheia, recomendada pelo fabricante – lote titulado no controle de qualidade da FortDodge – Paulínia/SP), $10^{3,99}$ DIE_{50} (1/2 dose) e $10^{3,68}$ DIE_{50} (1/4 dose) no primeiro dia de idade. Os grupos IV e V receberam somente o diluente utilizado na vacinação. Aos 28 dias de idade foi realizado o desafio dos grupos I, II, III e IV com a estirpe M41 ($10^{4.0}$ DIE_{50}) do VBI, via óculo-nasal. Portanto, o grupo IV foi considerado o controle positivo (CP) da infecção pelo VBI, e o grupo V, o controle negativo (CN) da infecção. Foram colhidas amostras de soro e de lágrima nos intervalos de uma, duas, três e quatro semanas pós-vacinação, e, amostras de soro, lágrima e traquéia nos intervalos 24h e 5 dpi. Para cada intervalo foram sacrificadas sete aves por grupo. As amostras de soro e de lágrima foram armazenadas a –20°C, até o momento de serem processadas pela técnica de ELISA; parte das amostras de traquéia foi destinada à avaliação da ciliostase (movimento ciliar da traquéia), outra parte à histopatologia, e o restante das amostras teciduais foram submetidas ao congelamento rápido em nitrogênio líquido e armazenadas a –70°C até o momento de serem processadas pela técnica de extração de RNA.

5.5 Mensuração de anticorpos locais e sistêmicos contra o VBI

Para mensuração de anticorpos anti-VBI dos isótipos IgG, IgA e IgM foi utilizado o teste de Sandwich-ELISA-Concanavalina A (S-ELISA-ConA), segundo as recomendações de BRONZONI et al. (2005) para avaliar os níveis de anticorpos (Acs) anti-VBI sob a forma dos diferentes isótipos (IgG, IgM e IgA) presentes, tanto no soro sanguíneo como na secreção lacrimal em amostras colhidas das aves submetidas à infecção experimental.

Resumidamente, 50 µL de Concanavalina A (0,05 mg/mL de PBS pH 7,4) foram aplicados nas cavidades da microplaca de poliestireno (Costar). A microplaca foi incubada a 4°C "overnight". A Concanavalina em excesso foi eliminada, por três lavagens das cavidades da microplaca com tampão PBS acrescido de Tween 20 0,1% (PBST) pH 7,4.

Foi realizado o bloqueio com tampão PBS acrescido de leite em pó desnatado (LPD) a 10% (100 µL por cavidade), a microplaca foi incubada a 37°C durante 45 minutos, e em seguida lavada três vezes com tampão PBST.

Em seguida foram adicionados 50 µL de vírus (estirpe H120 do vírus da BI) diluído em PBS (pH 7,4) acrescido de 10% de LPD por cavidade, sendo a microplaca incubada a 37° por uma hora.

Após nova lavagem da microplaca, foram adicionadas as amostras-teste (soro ou lágrima), em duplicata, e de forma comparativa aos padrões de amostras positiva e negativas, e incubado durante uma hora a 37°C. As amostras de soro foram diluídas em tampão PBS acrescido de 10% de LPD na proporção de 1:100, e as de lágrima na proporção de 1:25. As microplacas foram lavadas três vezes com tampão PBST.

Acrescentou-se 50 µL do anticorpo anti-galinha conjugado com peroxidase (Bethyl), para os isótipos IgA (1:4000), IgM (1:800) e IgG (1:6250), incubando-se durante duas horas a 37°C.

Após novo ciclo de lavagens das microplacas, por três vezes com PBST, foram acrescidos 50 µL de solução do substrato-cromógeno Orto-fenileno-diamina (OPD, Sigma) diluído em tampão citrato fosfato 0,05 M pH 5,0, contendo 0,006% de H_2O_2.

Após um período de incubação de 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação de degradação enzimática do substrato foi bloqueada pela adição de 50 μL/cavidade de ácido clorídrico 1 M, sendo, ao final, as densidades ópticas (DO) obtidas, mensuradas em leitor de microplaca a 490nm (Bio-Rad, Modelo-550, USA).

Para a obtenção do melhor desempenho da reação, foram realizados testes com diferentes diluições do vírus, da amostra-teste (soro e lágrima) e do anticorpo conjugado.

Os valores de DO obtidos foram convertidos em A/P (amostra x positivo).

$$AP = \frac{\text{(DO amostra teste – DO controle negativo)}}{\text{(DO controle positivo – DO controle negativo)}}$$

5.6 Quantificação da expressão de genes relacionados às respostas imunes e da replicação viral

5.6.1 Extração de RNA total

O procedimento de extração do RNA total das amostras de traquéia foi realizado com auxílio do kit comercial Trizol Reagent (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante.

Em resumo, as amostras de traquéia provenientes das aves infectadas experimentalmente (0,1g - 0,2 g) foram maceradas juntamente com 1000 μL de Trizol Reagent, utilizando-se um micropistilo em um microtubo. A mistura foi homogeneizada por 15 segundos no vórtex e incubada por cinco minutos à temperatura ambiente (TA). 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 TA, as amostras foram centrifugadas a 12000 xg durante 15 minutos a 4°C; aproximadamente 500 μL do sobrenadante foram separados e transferidos para outro microtubo (1,5 mL). As amostras de RNA foram precipitadas em 500 μL de isopropanol,

após incubação por dez minutos, a TA, e centrifugação 12000 xg, por dez minutos a 4°C. O isopropanol foi descartado e as amostras foram lavadas em 1000 µL de etanol (75%) e secas à TA. Em seguida, os precipitados foram ressuspensos em 12µL de água tratada com dietil - pirocarbonate 0,1% (DEPC).

5.6.2 Tratamento com DNAse

5.6.2.1 Desenvolvimento e otimização

O tratamento com DNAse foi realizado objetivando remover a quantidade de DNA carreado a partir da extração com kit TRIZOL Reagent, bem como a concentração de enzima DNAse necessária para a eliminação deste DNA residual, conforme preconizado por diversos autores (HEIDARI et al., 2008; HONG et al., 2006).

Primeiramente, foi conduzido um teste para verificar a presença de DNA carreado durante a extração de RNA. Realizada a extração de RNA da traquéia, parte do material foi submetida à RT conforme descrito anteriormente, e outra parte foi destinada a uma simulação da RT, mas sem a presença de OligodT; ambos foram submetidos à técnica de PCR em tempo real com utilização dos “primers” para amplificação do gene constitutivo 18S.

Confirmada a presença de DNA e necessidade de sua eliminação, procedeu-se o tratamento com a enzima DNAse, imediatamente em seqüência à extração do RNA. Em resumo, foram incubados a 37°C durante 30 minutos, 5,25 µL do RNA extraído, 1,125 µL do tampão 10 x (Fermentas), 0,25 µL de inibidor de ribonucleases (Fermentas), acrescidos de diferentes diluições da enzima DNAse (Fermentas) (0,5 U; 0,75 U; 1,0 U; 1,2 U e 1,5 U da enzima por micro litro de RNA extraído), completando-se o volume com água tratada com DEPC, perfazendo um total de 15 µL. Para inativação da atividade da enzima DNAse foi adicionado 1,5 µL de EDTA, e a mistura foi incubada a 65°C por 10 minutos.

5.6.2.2 Protocolo adotado

Imediatamente em seqüência à extração, o RNA foi submetido ao tratamento com a enzima DNAse. Em resumo, foram incubados a 37°C durante 30 minutos, 5,25 µL do RNA extraído, 1,125 µL do tampão 10 x (Fermentas), 0,25 µL de inibidor de ribonucleases (Fermentas), 6,0 µL de DNAse (Fermentas) (1,2 U/µL de RNA extraído) e 2,25 µL de água DEPC. Para inativação da atividade da enzima DNAse foram adicionados 2,0 µL de EDTA, incubando-se a mistura a 65°C por 10 minutos.

Para cada grupo de amostras teciduais extraídas, foi adicionado um controle de qualidade do tratamento da enzima DNAse, constituído de RNA extraído tratado com enzima DNAse, sem a realização da transcrição reversa, e submetido à amplificação por PCR em tempo real com o gene constitutivo 18S. O grupo de amostras teciduais extraídas, cujo controle de qualidade do tratamento de DNAse apresentou positividade para 18S, foi descartado e re-processado.

5.6.3 Transcrição reversa (RT)

A reação de transcrição reversa foi efetuada em um Termociclador PTC – 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) incubando-se a 65°C durante cinco minutos: 5 µL do RNA genômico extraído, dNTP 0,5 mM (Invitrogen), 0,5 µg de OligodT (IDT) e 3 µL de água DEPC. Em seguida, acrescentou-se o tampão da RT 5 x (Invitrogen), 1 µL de inibidor de ribonucleases (Fermentas) e incubou-se a 42°C durante dois minutos; após adição de 50 U da enzima SuperScript (Invitrogen), incubou-se a 42°C durante 50 minutos, e a 70°C por 15 minutos. O volume final da reação foi de 20 µL, o qual foi armazenado a –20°C para uso posterior na técnica de PCR em tempo real.

5.6.4 PCR em tempo real

5.6.4.1 Desenvolvimento e otimização

Para a padronização da quantificação relativa dos diferentes genes utilizados, foram testados diversos pares de oligonucleotídeos descritos na literatura, em

termociclador de gradiente, variando-se apenas a temperatura de anelamento (de 45°C a 65°C), visando maior sensibilidade e especificidade da reação.

Os pares de oligonucleotídeos que apresentaram resultados insatisfatórios (como o excesso de dímeros de "primers") foram descartados e substituídos por outros confeccionados de acordo com sequências gênicas descritas no Genbank e auxílio do programa computacional Primer3 (frodo.wi.mit.edu).

Para confirmação da amplificação específica dos diferentes pares de oligonucleotídeos utilizados, os produtos obtidos dos ensaios de PCR em tempo real foram acrescidos de 2 µL de tampão amostra [0,05% (p/v) de azul de bromofenol; 40% de sacarose (p/v); Tris-HCl 10 mM e pH 7,8; EDTA 1 M e pH 8,0] em 5 µL de produto amplificado, o qual foi analisado através de eletroforese horizontal no sistema , em tensão de 80 V por aproximadamente 90 minutos, em gel de agarose 1% contendo tampão TEB 0,5 X (Tris 0,045 M, ácido bórico 0,045 M e EDTA 0,001 M, pH 8,0) e brometo de etídio (0,5 µg/µL). Como padrão de peso molecular foi utilizado o marcador "100 bp DNA Ladder" (Invitrogen). Os géis foram visualizados através de incidência de luz ultravioleta em um transiluminador (Syngene), fotodocumentados com uma câmera digital (Synoptics) e processados por meio do software Gene Link (Syngene).

5.6.4.2 Protocolo adotado

Após a extração do RNA feita com a utilização do kit Trizol (Invitrogen), tratamento com enzima 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, sendo a reação conduzida em um aparelho termociclador Chromo 4 - PTC – 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research). Foi utilizado um volume de 2,0 µL de cDNA proveniente da RT, ao qual acrescentou-se 10,0 µL da mistura Maxima SYBR Green qPCR Master Mix 2 x (Fermentas), 10 pmol de cada "primer", completando-se com água para um volume final de 20 µl. As reações foram realizadas em microtubos especiais de 0,2 mL 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.

Foi realizada a quantificação relativa da expressão gênica das citocinas (IL1β, IL6, TNFα, IFNγ, IL10 e TGFβ), da Granzima A e do marcador de linfócito T citotóxico CD8+, a partir do cDNA obtido pela técnica de RT, utilizando-se a técnica de PCR em tempo real.

Para tanto, foram utilizados oligonucleotídeos específicos descritos na literatura ou construídos a partir de sequências gênicas descritas no Genbank.

O perfil térmico da PCR foi constituído por um primeiro ciclo de 95°C por dez minutos, seguindo-se de mais 45 ciclos, com exceção daquele usado para a reação com o par de oligonucleotídeos codificadores do gene 18S, no qual foram requeridos apenas 35 ciclos, compostos por desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento por 30 segundos (temperatura selecionada conforme resultado da PCR em tempo real com gradiente, determinada para cada par de oligonucleotídeos utilizado), e extensão a 72°C por 30 segundos. Ao final dessa etapa, foi realizada a dissociação dos produtos amplificados de DNA, entre a temperatura de 65°C e 95°C para a avaliação da Tm, e as leituras efetuadas a cada 0,2°C. Todas as amostras foram testadas, no mínimo, em duplicata.

A quantificação relativa da expressão gênica das citocinas e demais genes relacionados à imunidade celular foi realizada conforme o método descrito por LIVAK & SCHMITTGEN (2001), sendo a expressão de cada gene normalizada em relação ao gene 18S, utilizando-se como nível basal de expressão gênica as amostras provenientes de aves do grupo controle negativo (não imunizadas e não desafiadas).

Para a quantificação da replicação viral foi utilizado o método de quantificação absoluta, conforme recomendações descritas por OKINO (2007).

5.6.5 Construção da curva padrão

A curva padrão foi construída para quantificação relativa do cDNA. Um fragmento de cerca de 1,6 Kb do gene S1 da estirpe M41 do VBI foi clonado no vetor pGEM T Easy (Promega) (Figura 1). O DNA plasmidial foi extraído, quantificado através da leitura em biofotômetro (Eppendorf) e submetido a diluições seriadas de razão constante igual a 10 (10^{-1} a 10^{-10}), e em seguida à técnica de RT-PCR em tempo-real

com a utilização de “primers” para amplificação de sequência parcial do gene S1 do VBI (Tabela 3).

O valor obtido da quantificação do DNA plasmidial extraído foi convertido em número de moles utilizando-se o programa computacional Molbio.ru (www.molgen.mpg.de/~soldatov/protocols/scripts/01_07.html).

Os valores de CT obtidos a partir da RT-PCR em tempo real foram subseqüentemente usados para calcular e traçar uma linha de regressão linear através do logaritmo do número de moles do “template” (eixo Y) contra o valor correspondente de CT (eixo X).

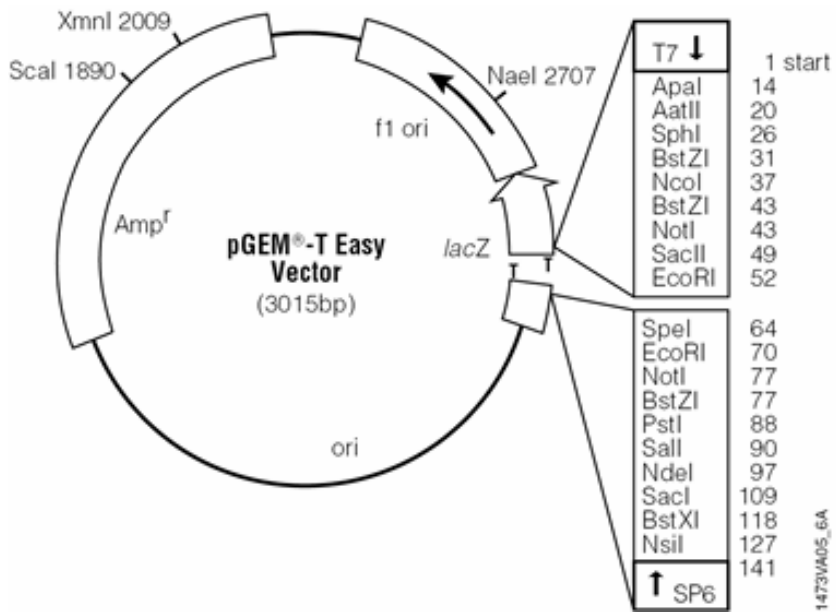


Figura 1. Representação esquemática do vetor pGEM T Easy (Promega), no qual foi clonado um fragmento do gene S1 da estirpe M41 do VBI.

5.7 Avaliação da ciliostase

Imediatamente após o sacrifício das aves, foram colhidas amostras de traquéia para a avaliação da ciliostase. Para tanto, foram analisados três fragmentos de aproximadamente 1,5 mm de cada porção (cranial, medial e distal), totalizando nove

anéis por ave. Os anéis traqueais foram dispostos sobre lâminas e imersos em Meio Eagle (Gibco) acrescido de 5% de soro fetal bovino; o movimento ciliar foi observado com auxílio de um microscópio invertido (Olympus CK2) sob aumento de 40 x, avaliando-se a integridade e o grau de conservação do movimento ciliar das células epiteliais da traquéia, segundo os procedimentos descritos por DARBYSHIRE & PETERS (1985).

Adotou-se 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 (ANDRADE et al., 1982; DI FABIO et al., 2000), conforme exposto na Tabela 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 a análise de nove anéis traqueais por ave, foi obtida a média de escore.

Tabela 1. Parâmetros de avaliação da ciliostase de anéis traqueais para a avaliação do estado de proteção frente ao desafio com o VBI.

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

5.8 Histopatologia da traquéia

As amostras dos segmentos de traquéia foram colhidas e processadas por técnicas histológicas usuais de fixação, desidratação, diafanização e coloração com hematoxilina-eosina (HE), para a realização do exame histopatológico.

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 com fosfato a 10%, pH 7,2. Após a fixação, os fragmentos foram desidratados, diafanizados para serem em seguida incluídos em parafina; secções transversais de 5 µm de espessura foram corados com HE. Essas etapas foram conduzidas no laboratório de histopatologia 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. Foi utilizado microscópio Nikon Eclipse E200, com câmera Moticam 2300 3.0 M Pixel USB 2.0, e auxílio do programa Motic Images Plus 2.0 ML para fotodocumentação.

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. Para avaliação histopatológica de cada ave, considerou-se a soma dos três anéis traqueais por ave, com o escore máximo de 54.

5.9 Análise estatística

Toda a análise estatística foi realizada empregando-se o programa computacional Graphpad Prisma 4 for Windows, versão 4.0, Inc. 2003, sendo adotados testes não paramétricos.

Para a determinação das diferenças das medianas entre os grupos do Delineamento experimental I relativos à expressão gênica, ELISA, histopatologia e ciliostase, foi utilizado o teste de Mann-Whitney (dois grupos experimentais); as diferenças das medianas entre os grupos do Delineamento experimental II relativos à

expressão gênica, ELISA, histopatologia e ciliostase foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis (mais de dois grupos experimentais), seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn´s, ao nível de 5% de probabilidade.

As análises de correlação entre os ensaios foram determinadas pelo método de Spearman, ao nível de significância de 5%. Os diferentes graus de correlação entre os ensaios foram classificados de acordo com o Quadro 1.

Os resultados de mensuração dos anticorpos anti-VBI sistêmicos (soro) e locais (lágrima) foram correlacionados com os de lesões histopatológicas, de ciliostase e de replicação viral.

Similarmente, foram realizadas correlações entre os resultados de quantificação da expressão dos genes imuno-relacionados e as lesões traqueais avaliadas pelo teste de estase ciliar e/ou histopatologia, para cada intervalo pós-infecção analisado.

Quadro 1. Classificação de grau de correlação de acordo com valor do coeficiente de correlação (r) e respectivas cores relacionadas.

Valores de r	**Descrição**	**Cor do quadrado**
+ 1,00	Correlação positiva perfeita	
+ 0,70 a 0,99	Correlação positiva muito forte	
+ 0,50 a 0,69	Correlação positiva substancial	
+ 0,30 a 0,49	Correlação positiva moderada	
+ 0,01 a 0,29	Correlação positiva baixa	
0,00	Nenhuma Correlação	
- 0,01 a 0,29	Correlação negativa baixa	
- 0,30 a 0,49	Correlação negativa moderada	
- 0,50 a 0,69	Correlação negativa substancial	
- 0,70 a 0,99	Correlação negativa muito forte	
- 1,00	Correlação negativa perfeita	

6 RESULTADOS

6.1 Determinação da infectividade viral

O título infectante da estirpe M41 do VBI, determinado por titulação viral em ovos embrionados SPF foi igual a $10^{6,1760}$ $DIE_{50\%}$ / ml.

6.2 Desenvolvimento e otimização dos ensaios para quantificação da expressão gênica e da replicação viral

6.2.1 Técnica de PCR em tempo real

As temperaturas de anelamento foram selecionadas conforme maior sensibilidade, isto é, um menor valor de Ct apresentado para amostra positiva, e ausência de dímeros de "primers" para a amostra negativa. Para o par de oligonucleotídeos codificadores do gene 18S, observou-se a presença de dímeros, independentemente da elevação da temperatura de anelamento, quando realizados 45 ciclos. No entanto, a fase de amplificação exponencial antecede os 20 ciclos, portanto, foi adotado um perfil de ciclagem de 30 ciclos, evitando a amplificação inespecífica de dímeros de "primers". Essa e as demais temperaturas de anelamento selecionadas encontram-se apresentadas na Tabela 2.

Conforme observado na eletroforese em gel de agarose (Figura 2), os fragmentos amplificados apresentaram tamanho esperado, baseando-se em sequências cadastradas no Genbank (Tabela 2). Portanto, a amplificação por PCR em tempo real foi considerada específica para todos os pares de oligonucleotídeos utilizados. Para a amplificação de uma região do gene S1 do VBI, foram adotadas as condições ideais descritas por OKINO (2007).

Tabela 2. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na técnica de PCR em tempo real, incluindo número de acesso, comprimento dos fragmentos amplificados, temperatura de anelamento e número de ciclos, para a quantificação absoluta da replicação viral e quantificação relativa da expressão de genes relacionados às respostas imunes na traquéia das galinhas infectadas experimentalmente.

Gene	N° acesso	Sequência	PB	Referência	T° anelamento	Número de ciclos
S1 (VBI)	M21883	F- TGGTTGGCATTTACACGGGG	227	OKINO (2007)	51,9°C	45
		R- CAATGTGTAACAAACAC				
IL-1β	Y15006	F-GTTGCTGGTTTCCATCTCGT	213	Desenhado	60,0°C	45
		R-TAAATACCTCCACCCCGACA				
IL-6	AJ309540	F-CAAGGTGACGGAGGAGGAC	254	HONG et al. (2006)	60,0°C	45
		R-TGGCGAGGAGGGATTTCT				
IL-10	AJ621614	F- TTCAGCTTGGATGTGTGAGC	150	Desenhado	60,0°C	45
		R- TGTCAGTTCTGCATGCTTCC				
IFN-γ	Y07922	F-AGCTGACGGTGGACCTATTATT	259	HONG et al. (2006)	55,5°C	45
		R-GGCTTTGCGCTGGATTC				
TNFSF15	NM_001024578	F- CCTGAGTTATTCCAGCAACGCA	292	PARK et al. (2007)	60,0°C	45
		R- TCCACCAGCTTGATGTCACTAAC				
TGF-β	M31160	F-CGGGACGGATGAGAAGAAC	258	HONG et al. (2006)	55,5°C	45
		R-CGGCCCACGTAGTAAATGAT				
GraA	BU409623	F-TGGGTGTTAACAGCTGCTCATTGC	214	Desenhado	65,0°C	41
		R-GGGGAATGACTTTCACAGCGCTA				
CD8+	Z22726	F-TTGGACGGGACCTTACAGAC	219	Desenhado	56,1°C	45
		R-TGAAGGGAGCAAAGGAGAAA				
18S	FM165414	F- CATGGCCGTTCTTAGTTGGT	232	Desenhado	49,2°C	30
		R- GGCGTAGGGTAGACACAAGC				

pb = pares de bases (do fragmento amplificado); f = “forward” ou “sense”; r = “reverse” ou “antisense”

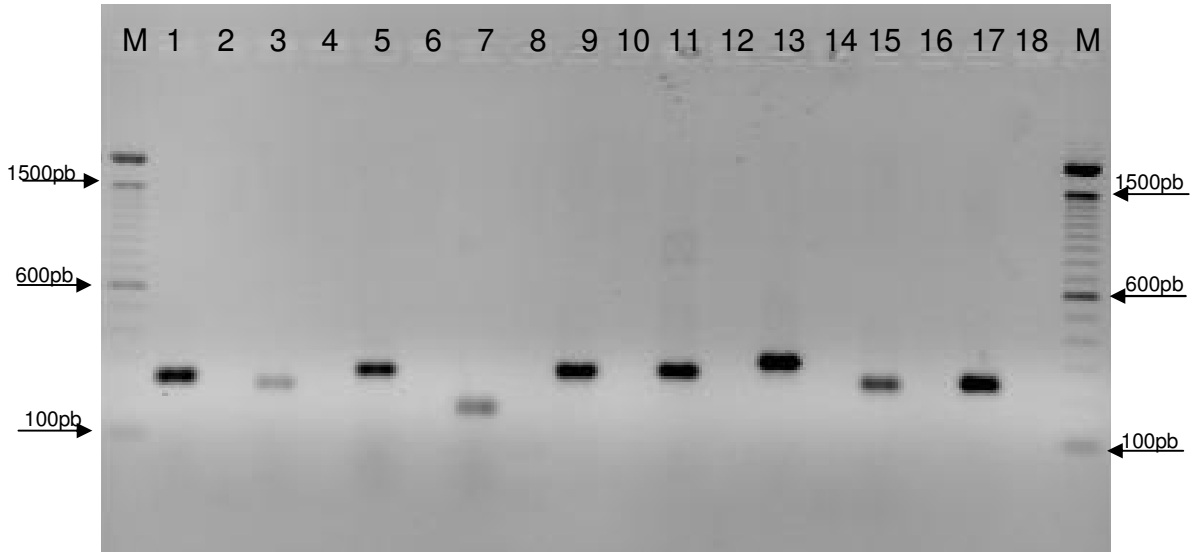


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo de fragmentos amplificados dos diferentes genes utilizados na quantificação relativa da expressão de genes relacionados às respostas imunes. Legenda: (M) Marcador 100 bp Ladder (Invitrogen), (1) 18S – Controle positivo, (2) 18S – Controle negativo, (3) Granzima homóloga A – Controle positivo, (4) Granzima homóloga A – Controle negativo, (5) IL6 – Controle positivo, (6) IL6 – Controle negativo, (7) IL10 – Controle positivo, (8) IL10 – Controle negativo, (9) IFNγ - Controle positivo, (10) IFNγ - Controle negativo, (11) TGF – Controle positivo, (12) TGF – Controle negativo, (13) TNF – Controle positivo, (14) TNF – Controle negativo, (15) CD8+ - Controle positivo, (16) CD8+ - Controle negativo, (17) IL1β – Controle positivo, (18) IL1β – Controle negativo.

6.2.2 Remoção de contaminação com DNA no RNA extraído pelo tratamento com enzima DNAse

Conforme observado na Figura 3, uma quantidade significativa de DNA é, de fato, carreado a partir da extração de RNA, confirmando a necessidade de um tratamento com enzima DNAse previamente à realização de RT.

Confirmada, assim, a necessidade de tratamento com enzima DNAse, foram realizados testes para se avaliar a concentração de enzima necessária para degradação completa do DNA carreado. Foram suficientes 0,75 U da enzima DNAse para cada um microlitro de RNA extraído a ser tratado; e, com intuito de evitar falhas, adotou-se a quantidade de 1,2 U da enzima para cada um micro litro de RNA.

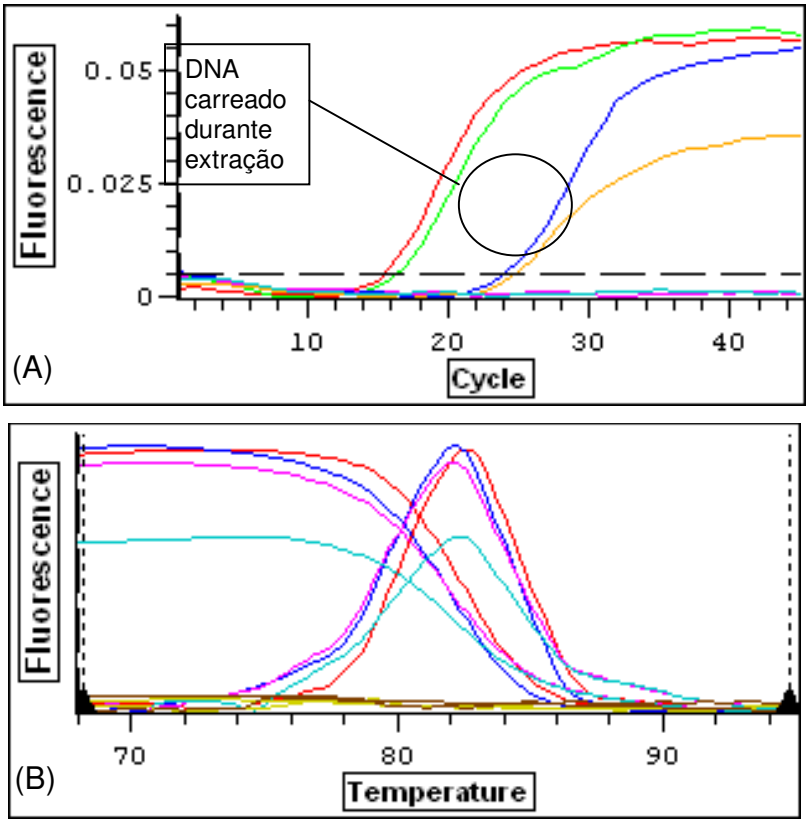


Figura 3. Resultados obtidos a partir do teste para verificar a presença de DNA carreado durante extração de RNA. (A) Curvas de amplificação. Legenda: Linha vermelha e verde – material submetido à RT com OligodT. Linha azul e amarela – material submetido a uma simulação da RT sem a presença de OligodT. (B) Curvas de dissociação. Legenda: Linha azul escuro e vermelha – material submetido à RT com OligodT. Linha rosa e azul claro – material submetido a uma simulação da RT sem a presença de OligodT.

6.2.3 Construção da curva padrão para quantificação absoluta da replicação viral

A equação linear gerada a partir da curva padrão foi y = -0,268 x + 10,96 com coeficiente de correlação (r^2) = 0,997 (Figura 4). O teste manteve linearidade por, no mínimo, sete ordens de magnitude; usando-se o coeficiente angular da equação linear, a eficiência do teste foi estimada em 85,35. O desvio padrão dos valores de C(T) obtidos para cada reação contendo de 10^1 a 10^9 cópias de DNA calculadas a partir de nove corridas independentes, variou de 0 a 1,22 ciclos.

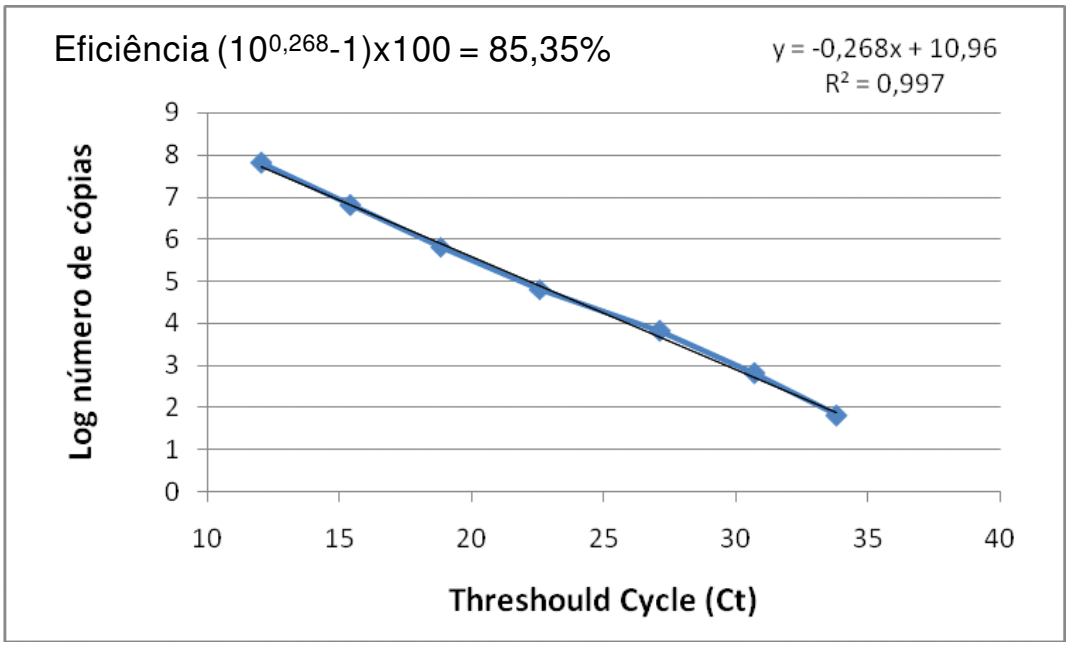


Figura 4. Curva padrão gerada com uso dos valores de C(T) vs. Log_{10} das diluições seriadas de razão 10 (10^{-3} a 10^{-9}) do DNA plasmidial correspondente ao gene S1 do VBI. A eficiência da reação foi de 85,35%, estimada com base no coeficiente angular da reta como indicado pela fórmula.

6.3 Delineamento experimental I: avaliação comparativa entre alterações de parâmetros da resposta imune nos diferentes intervalos pós-infecção

6.3.1 Mensuração de anticorpos locais e sistêmicos contra o VBI

As amostras de soro e lágrima colhidas nos intervalos de uma, duas e três semanas após a vacinação não apresentaram positividade para nenhum dos isótipos de anticorpos testados.

Em relação às amostras de soro colhidas das aves infectadas experimentalmente com estirpe M41 do VBI, pôde ser observado um pico de aumento dos níveis de anticorpos IgM no sétimo dia pi, e de IgG no 14° dia pi (Figuras 5 e 7), enquanto que os anticorpos do isótipo IgA não apresentaram nenhum aumento.

Quanto à produção de anticorpos no compartimento das mucosas (lágrima), foram observadas elevações maiores de IgG, IgM e IgA apenas no décimo quarto dia pi (Figuras 6, 8 e 9). Não foram verificadas diferenças significativas entre os níveis de

anticorpos dos grupos vacinado e controle (não vacinado), em nenhum dos intervalos pré e pós-desafio avaliados.

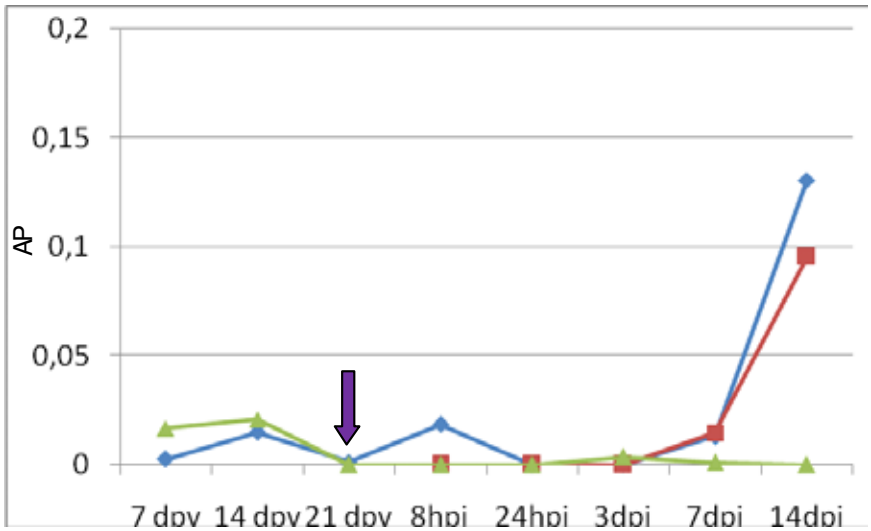


Figura 5. Perfil cinético (médias) da produção de anticorpos do isótipo IgG anti-VBI detectados pelo S-ELISA-ConA nas amostras de soro das aves do Delineamento experimental I, nos diferentes intervalos pós-vacinação (pv) ou pós-infecção (pi). Legenda: Seta roxa - dia do desafio; Linha azul – aves SPF vacinadas com estirpe H120 no primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 do VBI aos 21 dias de idade; Linha vermelha – aves SPF não vacinadas e desafiadas aos 21 dias de idade com estirpe M41 do VBI (Controle positivo da infecção); Linha verde – aves SPF não imunizadas e não desafiadas (Controle negativo da infecção).

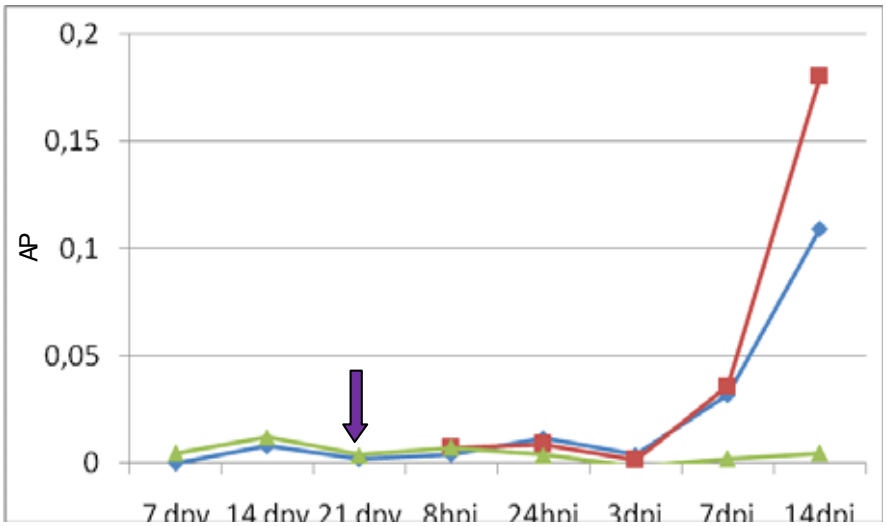


Figura 6. Perfil cinético (médias) da produção de anticorpos do isótipo IgG anti-VBI detectados pelo S-ELISA-ConA nas amostras de lágrima das aves do Delineamento experimental I, nos diferentes intervalos pós-vacinação (pv) ou pós-infecção (pi). Legenda: Seta roxa - dia do desafio; Linha azul – aves SPF vacinadas com estirpe H120 no primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 do VBI aos 21 dias de idade; Linha vermelha – aves SPF não vacinadas e desafiadas aos 21 dias de idade com estirpe M41 do VBI (Controle positivo da infecção); Linha verde – aves SPF não imunizadas e não desafiadas (Controle negativo da infecção).

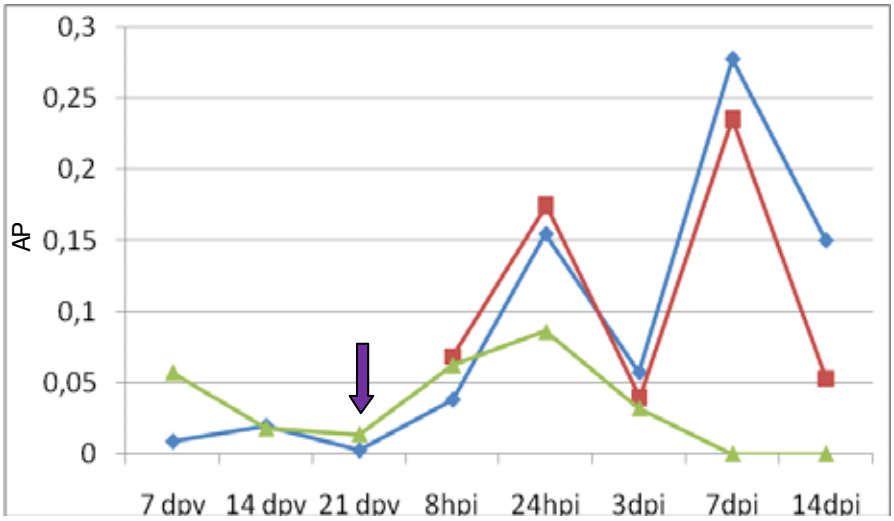


Figura 7. Perfil cinético (médias) da produção de anticorpos do isótipo IgM anti-VBI detectados pelo S-ELISA-ConA nas amostras de soro das aves do Delineamento experimental I, nos diferentes intervalos pós-vacinação (pv) ou pós-infecção (pi). Legenda: Seta roxa - dia do desafio; Linha azul – aves SPF vacinadas com estirpe H120 no primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 do VBI aos 21 dias de idade; Linha vermelha – aves SPF não vacinadas e desafiadas aos 21 dias de idade com estirpe M41 do VBI (Controle positivo da infecção); Linha verde – aves SPF não imunizadas e não desafiadas (Controle negativo da infecção).

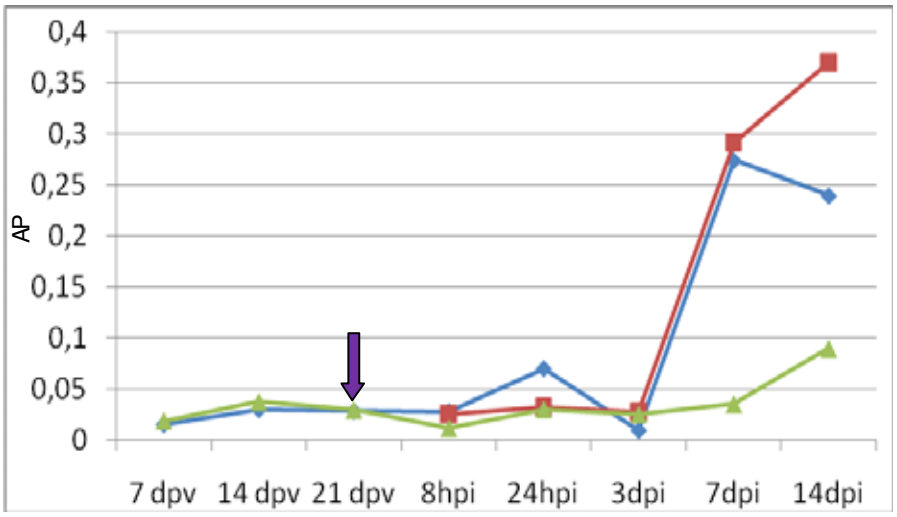


Figura 8. Perfil cinético (médias) da produção de anticorpos do isótipo IgM anti-VBI detectados pelo S-ELISA-ConA nas amostras de lágrima das aves do Delineamento experimental I, nos diferentes intervalos pós-vacinação (pv) ou pós-infecção (pi). Legenda: Seta roxa - dia do desafio; Linha azul – aves SPF vacinadas com estirpe H120 no primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 do VBI aos 21 dias de idade; Linha vermelha – aves SPF não vacinadas e desafiadas aos 21 dias de idade com estirpe M41 do VBI (Controle positivo da infecção); Linha verde – aves SPF não imunizadas e não desafiadas (Controle negativo da infecção).

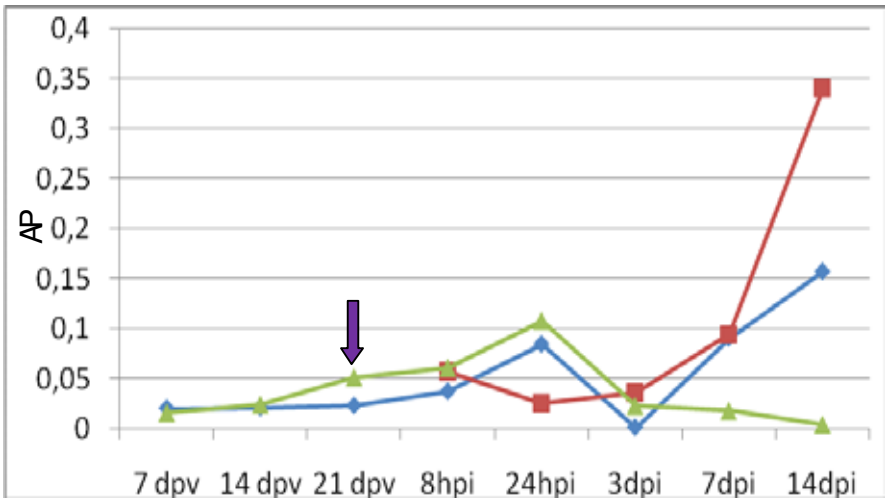


Figura 9. Perfil cinético (médias) da produção de anticorpos do isótipo IgA anti-VBI detectados pelo S-ELISA-ConA nas amostras de lágrima das aves do Delineamento experimental I, nos diferentes intervalos pós-vacinação (pv) ou pós-infecção (pi). Legenda: Seta roxa - dia do desafio; Linha azul – aves SPF vacinadas com estirpe H120 no primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 do VBI aos 21 dias de idade; Linha vermelha – aves SPF não vacinadas e desafiadas aos 21 dias de idade com estirpe M41 do VBI (Controle positivo da infecção); Linha verde – aves SPF não imunizadas e não desafiadas (Controle negativo da infecção).

6.3.2 Quantificação relativa da expressão de genes relacionados às respostas imunes

Os resultados da quantificação relativa da expressão de genes relacionados à resposta imune celular das amostras teciduais do Delineamento experimental I submetidas à extração com kit Trizol Reagent, tratamento com enzima DNAse, transcrição reversa e PCR em tempo real com uso do marcador SYBR Green tipo I, para realização encontram-se sumarizados nas Figuras 10 a 17.

Aumento significativo da expressão gênica do marcador de linfócito T citotóxico CD8+ foi observado somente a partir do sétimo dpi em ambos os grupos, vacinado e não vacinado. As medianas entre os grupos vacinado e não vacinado, em todos intervalos pós-infecção, não apresentaram diferenças significativas, embora maiores valores de expressão gênica tenham sido observados no grupo vacinado no sétimo dpi (Figura 10).

Em relação à quantificação do RNAm da Granzima homóloga A, aumento significativo foi observado a partir do terceiro dpi, atingindo pico ao sétimo dpi (Figura 11). Comparando-se as medianas entre os grupos, o grupo vacinado apresentou valor significativamente aumentado (P=0,0159) de expressão em relação ao grupo não vacinado no sétimo dpi; demais intervalos não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

Houve aumento significativo de IFNγ a partir de 24 hpi em ambos os grupos vacinado e não vacinado, sendo os picos de produção nos dias 7 e 3 pi, respectivamente. Diferença significativa entre os grupos somente foi observada no 7dpi (Figura 12).

A partir de 24 hpi foram observados aumentos significativos de IL1β em ambos os grupos vacinado e não vacinado, com picos de produção entre os dias 3 e 7 pi, (Figura 13). Não houve diferença significativa entre o grupo vacinado e não vacinado nos diferentes intervalos pós-infecção avaliados.

A IL6 apresentou aumento significativo de expressão a partir de 24 hpi no grupo não vacinado, e somente a partir do terceiro dpi para o grupo vacinado, sendo os

valores máximos observados aos 3dpi para ambos os grupos. Apenas no sétimo dpi foi observada diferença significativa entre os grupos vacinado e não vacinado (Figura 14).

Um aumento significativo da expressão de IL10 foi observado a partir de 24hpi no grupo vacinado, e a partir do terceiro dpi para o grupo não vacinado, sendo nesse intervalo encontrado o pico de expressão dessa citocina para ambos os grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos vacinado e não vacinado (Figura 15).

Em relação à quantificação do RNAm do TNF, aumento significativo foi observado somente no intervalo de 24hpi para ambos os grupos. Apesar dos maiores valores serem observados no grupo vacinado em relação ao não vacinado, a diferença não foi significativa (Figura 16).

O TGF apresentou aumento significativo de expressão após 24hpi em ambos os grupos; nesse intervalo foi também observado o pico de produção dessa citocina. Diferenças significativas entre os dois grupos foram observadas nos intervalos de 3 e 14 dpi (Figura 17).

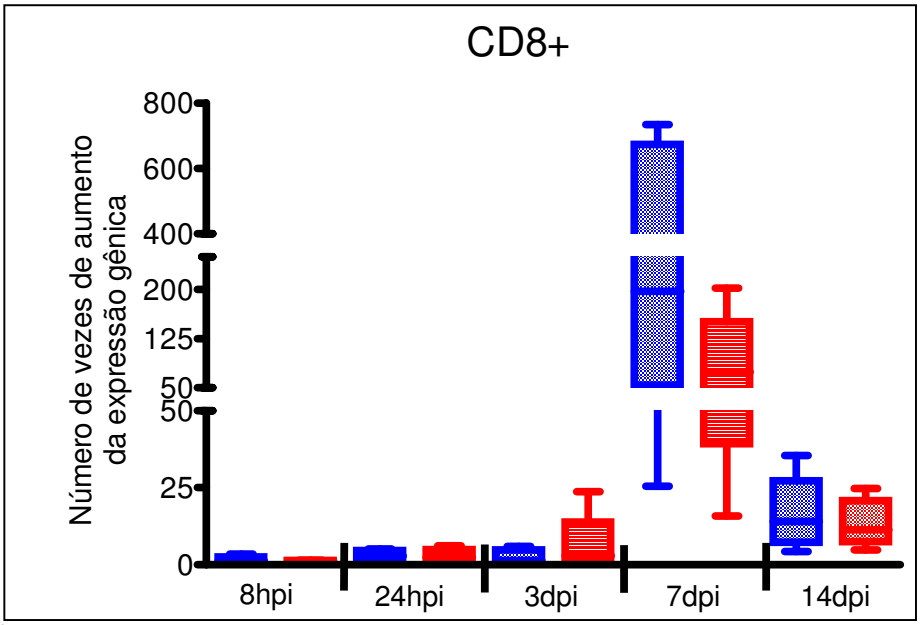


Figura 10. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador do marcador de linfócito T citotóxico CD8+, das aves dos grupos desafiados vacinado (azul) e não vacinado (vermelho), nos diferentes intervalos pós-desafio. Estão indicados na figura, mediana e desvio padrão da média. Não houve diferenças significativas pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos vacinado e não vacinado para cada intervalo avaliado ($p > 0,05$).

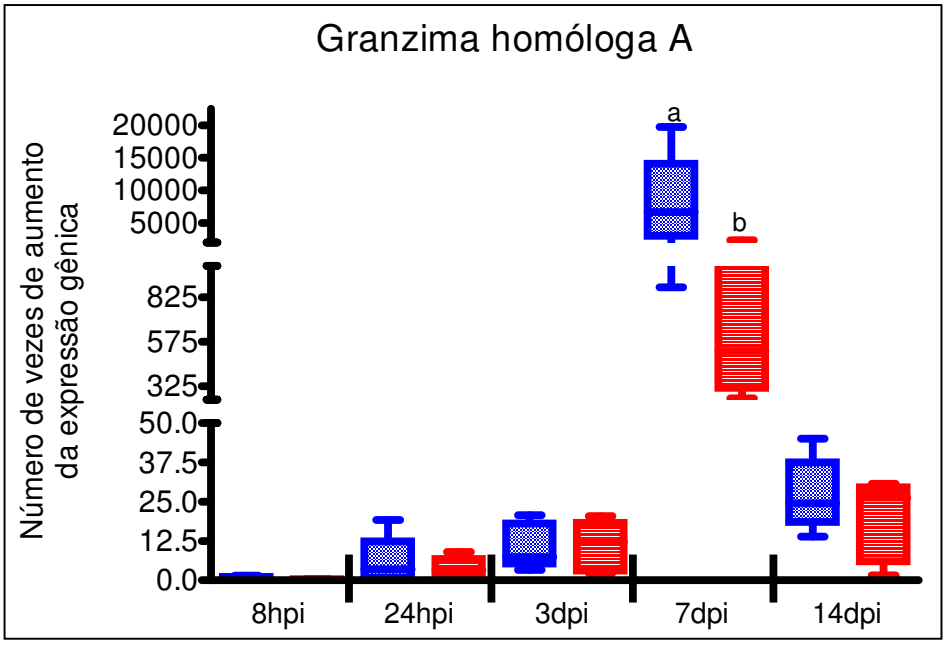


Figura 11. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador da Granzima homóloga A, das aves dos grupos desafiados vacinado (azul) e não vacinado (vermelho), nos diferentes intervalos pós-desafio. Estão indicados na figura, mediana e desvio padrão da média. (a,b) Diferenças significativas pelo teste de Mann-Whitney, ($p < 0,05$).

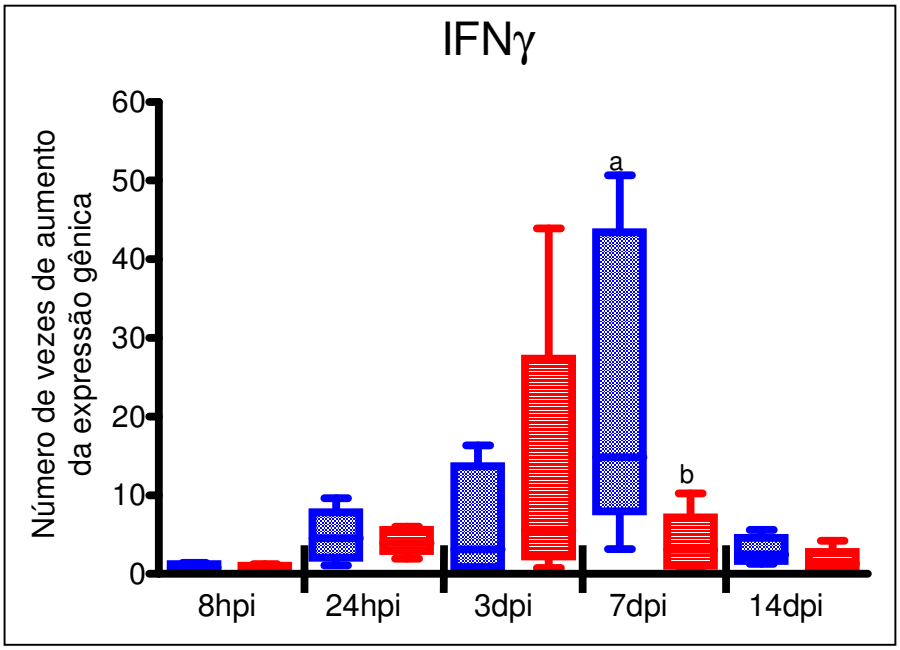


Figura 12. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador da Interferon gamma (IFNγ), das aves dos grupos desafiados vacinado (azul) e não vacinado (vermelho), nos diferentes intervalos pós-desafio. Estão indicados na figura, mediana e desvio padrão da média. (a,b) Diferenças significativas pelo teste de Mann-Whitney, ($p < 0,05$).

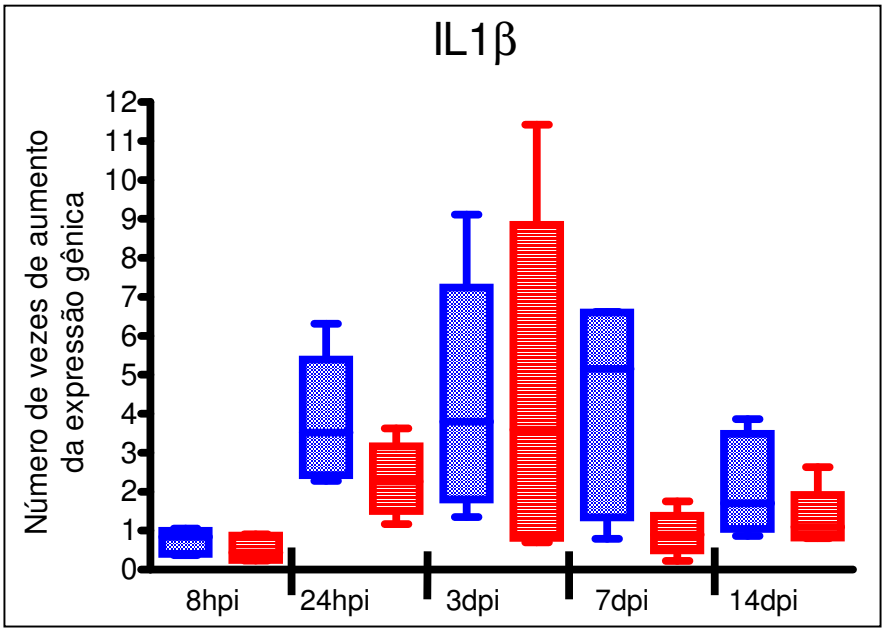


Figura 13. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador da Interleucina 1 beta (IL1β), das aves dos grupos desafiados vacinado (azul) e não vacinado (vermelho), nos diferentes intervalos pós-desafio. Estão indicados na figura, mediana e desvio padrão da média. Não houve diferenças significativas pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos vacinado e não vacinado para cada intervalo avaliado ($p > 0,05$).

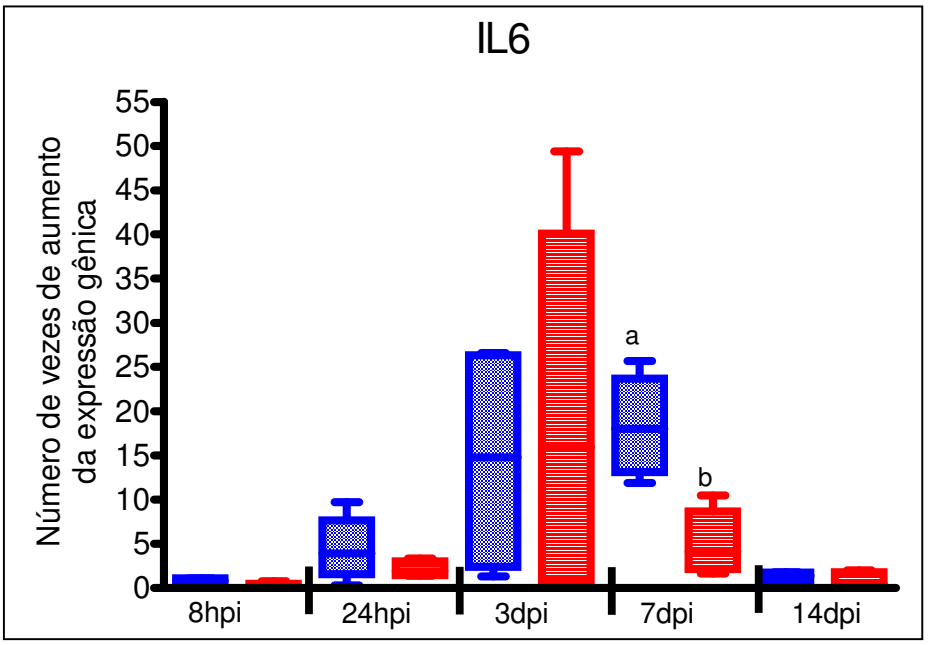


Figura 14. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador da Interleucina 6 (IL6), das aves dos grupos desafiados vacinado (azul) e não vacinado (vermelho), nos diferentes intervalos pós-desafio. Estão indicados na figura, mediana e desvio padrão da média. (a,b) Diferenças significativas pelo teste de Mann-Whitney, ($p < 0,05$).

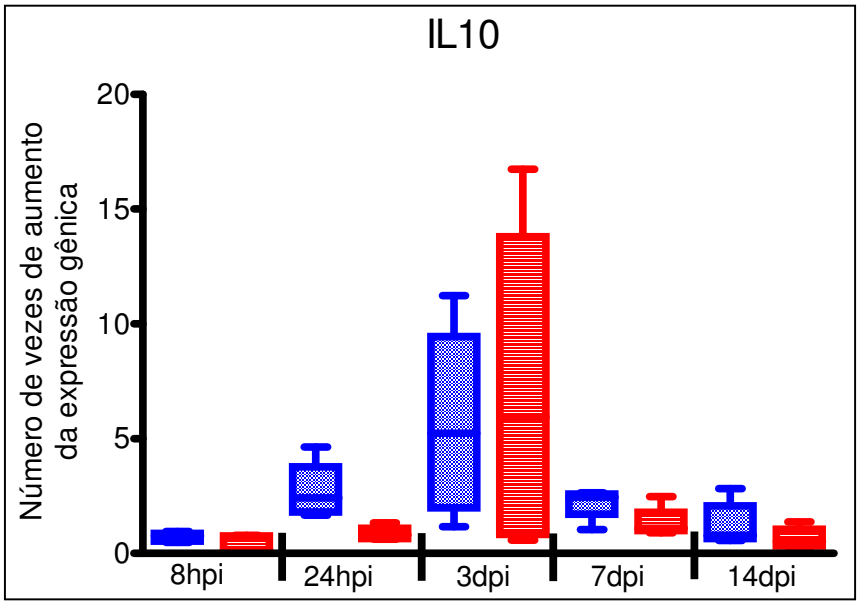


Figura 15. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador da Interleucina 10 (IL10), das aves dos grupos desafiados vacinado (azul) e não vacinado (vermelho), nos diferentes intervalos pós-desafio. Estão indicados na figura, mediana e desvio padrão da média. Não houve diferenças significativas pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos vacinado e não vacinado para cada intervalo avaliado ($p > 0,05$).

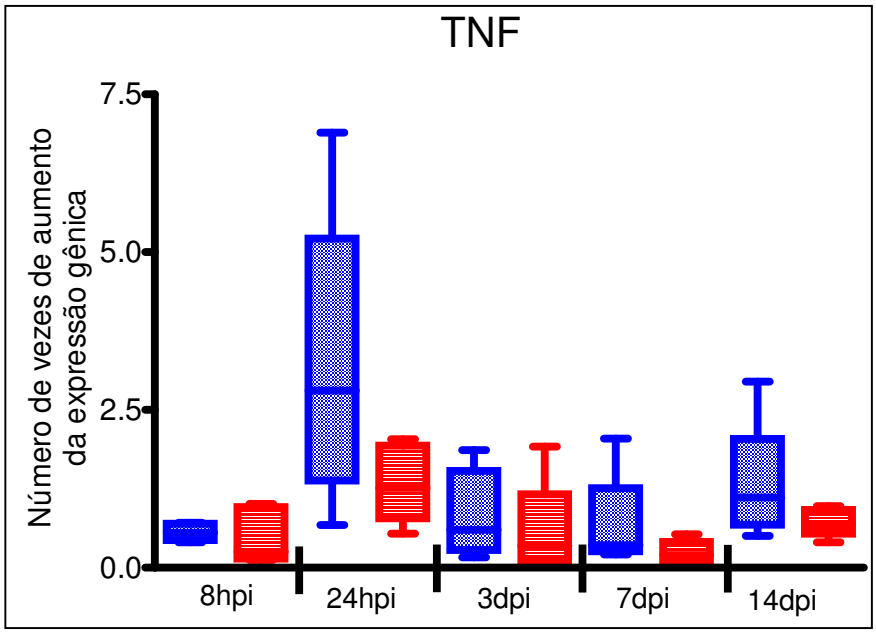


Figura 16. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador do Fator de necrose tumoral (TNF), das aves dos grupos desafiados vacinado (azul) e não vacinado (vermelho), nos diferentes intervalos pós-desafio. Estão indicados na figura, mediana e desvio padrão da média. Não houve diferenças significativas pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos vacinado e não vacinado para cada intervalo avaliado ($p > 0,05$).

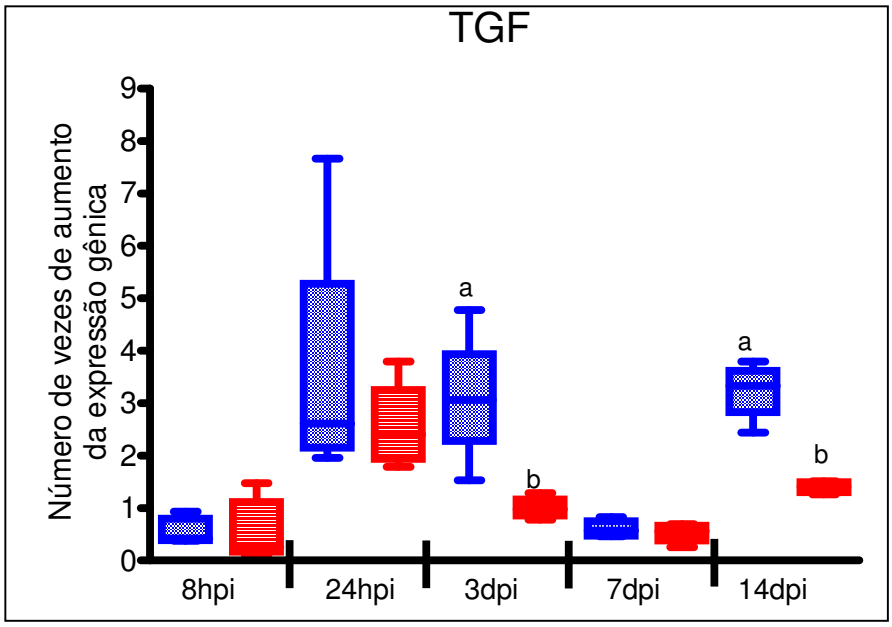


Figura 17. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador do Fator de transformação de crescimento (TGF), das aves dos grupos desafiados vacinado (azul) e não vacinado (vermelho), nos diferentes intervalos pós-desafio. Estão indicados na figura, mediana e desvio padrão da média. (a,b) Diferenças significativas pelo teste de Mann-Whitney, ($p < 0,05$).

6.3.3 Quantificação absoluta da replicação viral

Em relação aos resultados de replicação viral, essa foi observada a partir de 8hpi, com pico de replicação ao terceiro dpi (Figura 18); apesar de observados maiores valores de replicação viral no grupo não vacinado, as medianas não diferiram significativamente do grupo vacinado.

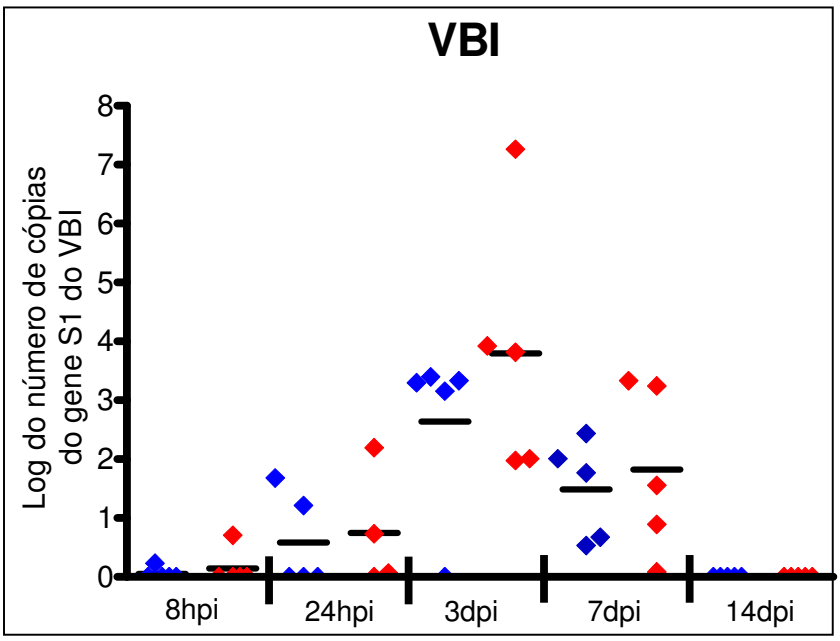


Figura 18. Número de cópias do gene S1 do VBI (Log10) detectados nas aves dos grupos vacinado e desafiado (quadrados azuis), e não vacinado e desafiado (triângulos vermelhos), nos diferentes intervalos pós-desafio. Está indicado na figura mediana (traço preto). Não houve diferenças significativas pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos vacinado e não vacinado para cada intervalo avaliado ($p > 0,05$).

6.3.4 Avaliação da ciliostase

Os testes de avaliação do movimento ciliar da traquéia permitiram inferir que somente a partir do terceiro dia pi foram observadas lesões, com média de escore de 1,4 para o grupo previamente vacinado ao desafio, e de 1,73 para o grupo desafiado e não vacinado (Tabela 3 e Figura 19).

No sétimo dia pi, no qual as aves se encontravam em fase aguda da doença, as lesões foram melhor evidenciadas, com média de escore 2,27 para o grupo previamente vacinado e 3,2 para o grupo não vacinado. No décimo quarto dia pi, as lesões estavam reduzidas, já que as aves encontravam-se em fase de recuperação da doença (Tabela 3 e Figura 19).

Pelo teste de Mann-Whitney, não foram observadas diferenças significativas entre os escores de ciliostase das aves dos grupos vacinado e não vacinado.

Tabela 3. Avaliação do escore de inibição do movimento ciliar da traquéia (de 0 a 4) de aves do Delineamento experimental I, nos diferentes intervalos pós-infecção.

Pi	Grupo	Escore P	Escore M	Escore D	Escore total
8h	I	0	0	0	0
8h	II	0	0	0	0
8h	III	0	0	0	0
24h	I	0	0	0	0
24h	II	0	0	0	0
24h	III	0	0	0	0
3d	I	1,4	1,4	1,4	1,4
3d	II	1,4	1,6	2,2	1,73
3d	III	0	0	0	0
7d	I	2,6	2	2,2	2,27
7d	II	2,5	3,4	3,4	3,2
7d	III	0	0	0	0
14d	I	1,2	1	1	1,07
14d	II	1,4	1	1	1,13
14d	III	0	0	0	0

pi = intervalo pós-infecção; h= hora; d= dia; P= porção proximal; M= porção média; D= porção distal; I = grupo vacinado e desafiado com o VBI; II = grupo não desafiado com o VBI (controle positivo); III = grupo controle negativo (controle negativo)

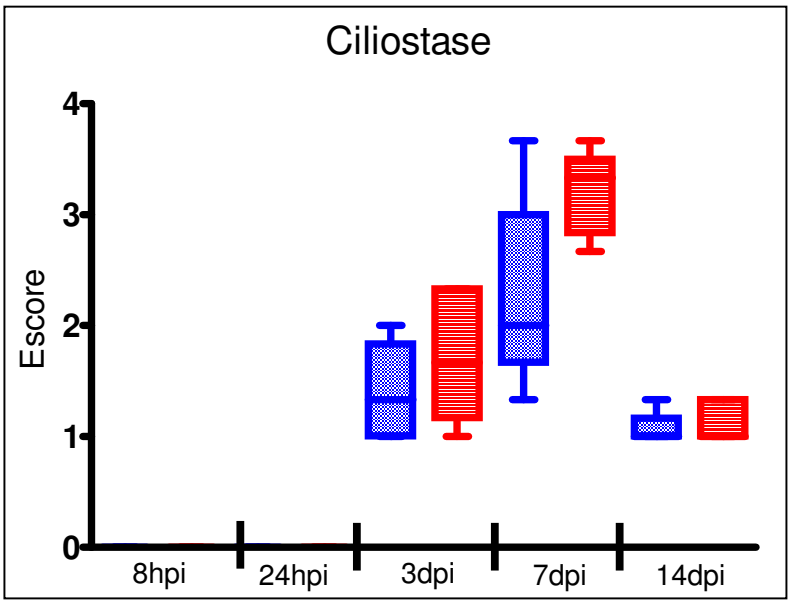


Figura 19. Comparação de escores totais de ciliostase na traquéia das aves dos grupos vacinado e desafiado (barras azuis), e não vacinado e desafiado (barras vermelhas), nos diferentes intervalos pós-desafio. Estão indicados na figura, mediana e desvio padrão da média. Não houve diferenças significativas pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos vacinado e não vacinado para cada intervalo avaliado ($p > 0,05$).

6.3.5 Histopatologia da traquéia

Alterações histopatológicas significativas na traquéia foram observadas somente a partir do terceiro dpi, sendo os maiores escores de lesão encontrados aos 7 dpi. Aos 14 dpi, lesões traqueais em ambos os grupos regridem e há regeneração do epitélio ciliado (Figura 20).

Dentre os parâmetros avaliados, a hiperplasia epitelial foi um evento observado em poucas aves; somente em uma ave ao terceiro dpi (do grupo não vacinado e desafiado), e em três aves no sétimo dpi (sendo uma ave previamente vacinada e desafiada, e as outras não vacinadas e desafiadas).

Outro parâmetro raramente observado foi inflamação da camada adventícia, encontrada em 60% das aves do grupo vacinado e desafiado no terceiro dpi, e em uma única ave desse mesmo grupo no sétimo dpi. Notadamente, essas aves, apresentaram também elevados escores de infiltração de células inflamatórias na camada mucosa.

Embora médias menores de escores de lesões histopatológicas tenham sido obtidas no grupo previamente vacinado, comparando-se ao grupo não vacinado e desafiado, as medianas não diferiram estatisticamente em nenhum dos intervalos pós-infecção avaliados.

Foram documentadas fotomicrografias de corte transversal de traquéia, representativas dos diferentes escores de infiltração na camada mucosa: escore 0 (Figuras 21 e 22), escore 1 (Figura 23), escore 2 (Figura 24) e escore 3 (Figura 25).

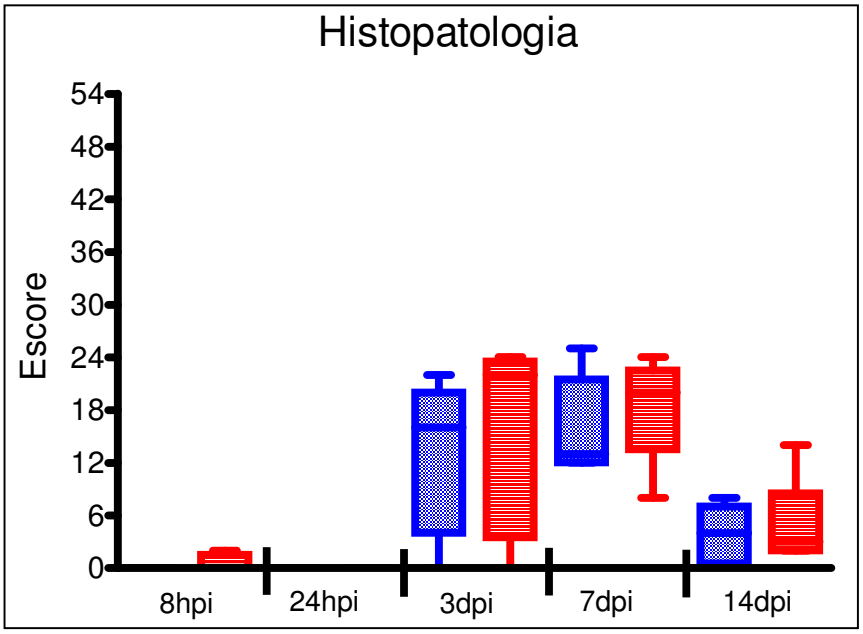


Figura 20. Comparação entre os resultados de escores da histopatologia das aves dos grupos vacinado (barras azuis) e não vacinado (barras vermelhas), nos diferentes intervalos pós-desafio. Estão indicados na figura mediana e erro padrão da média. (a,b) . Não houve diferenças significativas pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos vacinado e não vacinado para cada intervalo avaliado ($p > 0,05$).

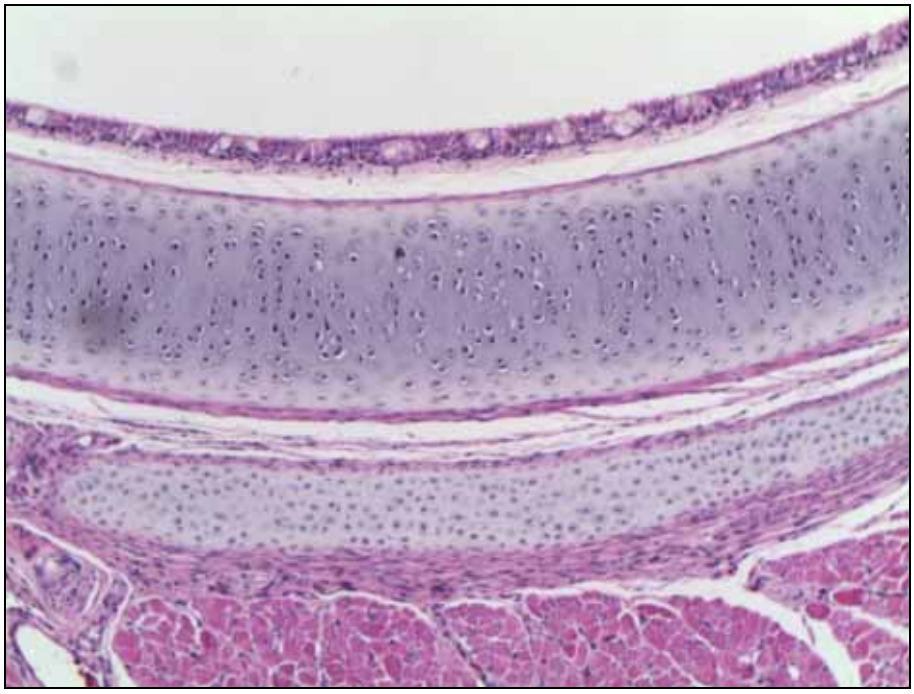


Figura 21. Fotomicrografia de traquéia da galinha do grupo controle negativo (não vacinada e não desafiada com o VBI), aos 21 dias de idade. HE, obj. 10x.

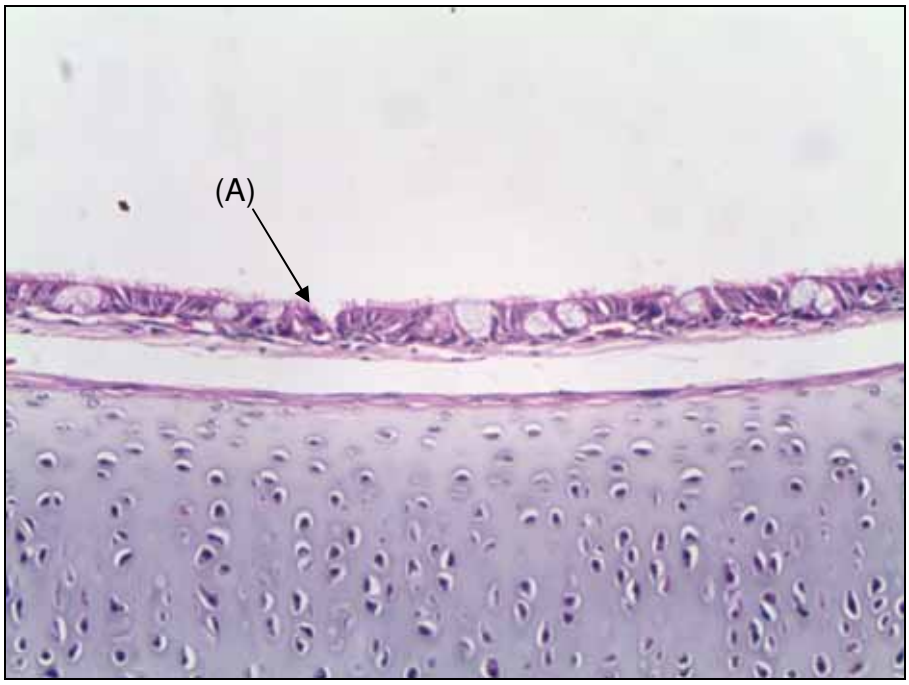


Figura 22. Fotomicrografia de traquéia de galinha do grupo controle negativo (não vacinada e não desafiada com o VBI), aos 21 dias de idade. HE, obj. 20x. Legenda: (A) Preservação de cílios e células epiteliais.

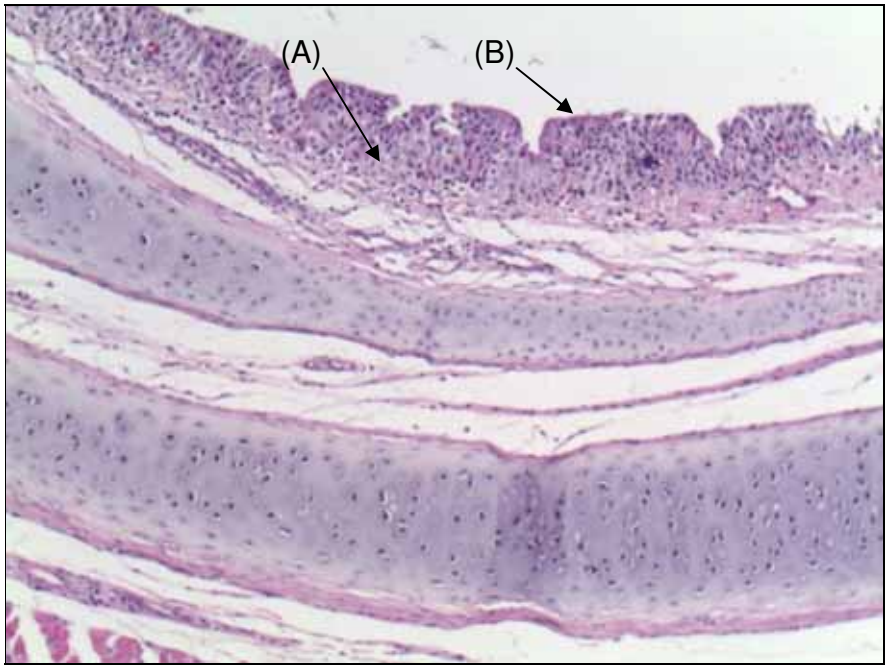


Figura 23. Fotomicrografia de traquéia de galinha do grupo controle positivo (somente desafiada com o VBI) no sétimo dia pós-infecção. HE, obj. 10x Legendas: (A) Infiltração de células inflamatórias de escore 1, (B) Perda de células epiteliais e de cílios.

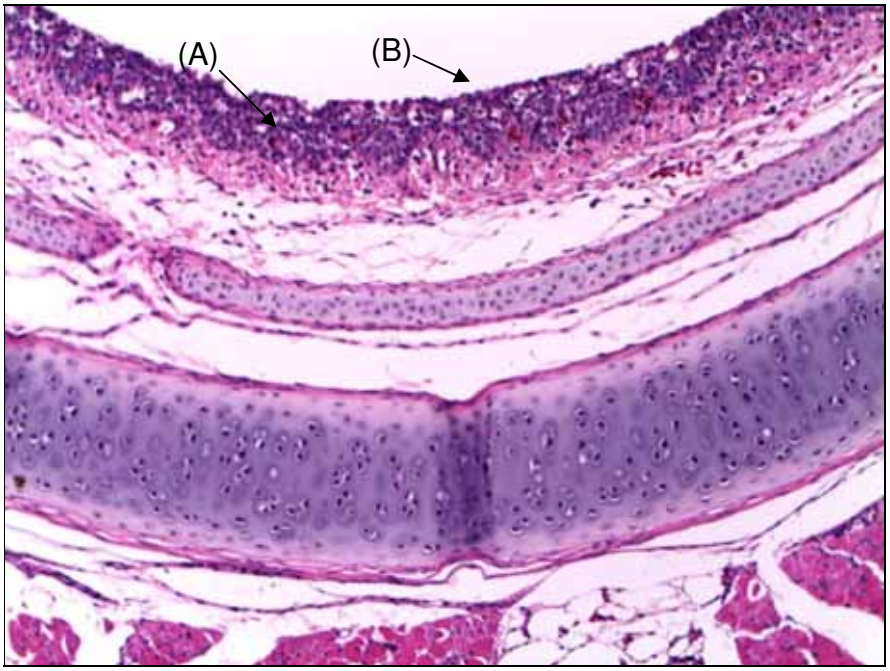


Figura 24. Fotomicrografia de traquéia de galinha do grupo não vacinado e desafiado com o VBI, no terceiro dia pós-infecção. HE, obj. 10x. Legendas: (A) Infiltração de células inflamatórias de escore 2, (B) Perda parcial de células epiteliais e de cílios.

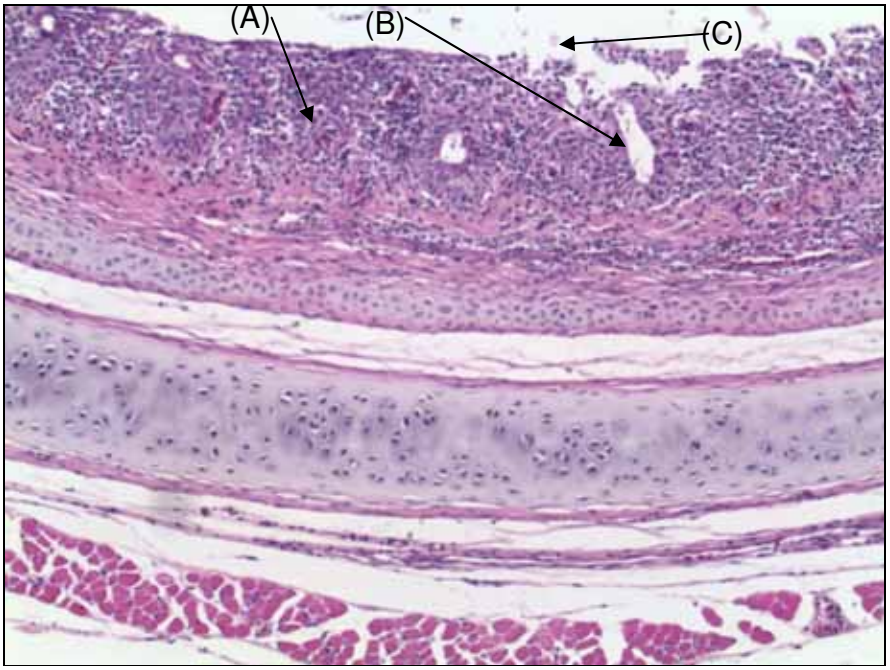


Figura 25. Fotomicrografia de traquéia de ave do grupo não vacinado e desafiado com o VBI no terceiro dia pós-infecção. HE, obj. 10x. Legendas: (A) Infiltração de células inflamatórias de escore 3, (B) Degeneração de glândulas, (C) Perda de células epiteliais e de cílios.

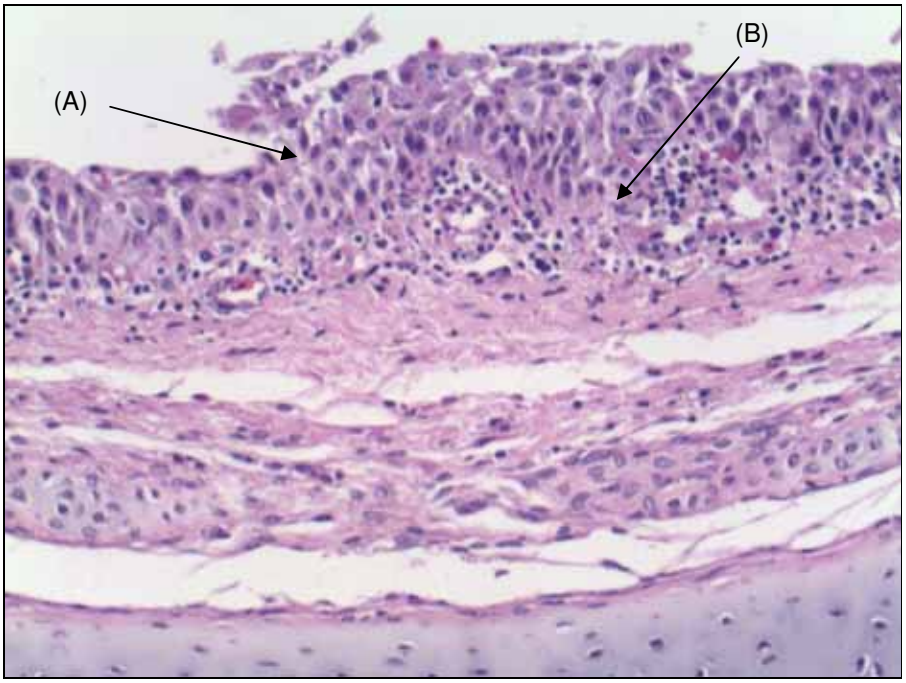


Figura 26. Fotomicrografia de traquéia de galinha do grupo não vacinado e desafiado com o VBI no sétimo dia pós-infecção. HE, obj. 20x. Legendas: (A) Hiperplasia epitelial de escore 3, (B) Infiltração de células inflamatórias de escore 2.

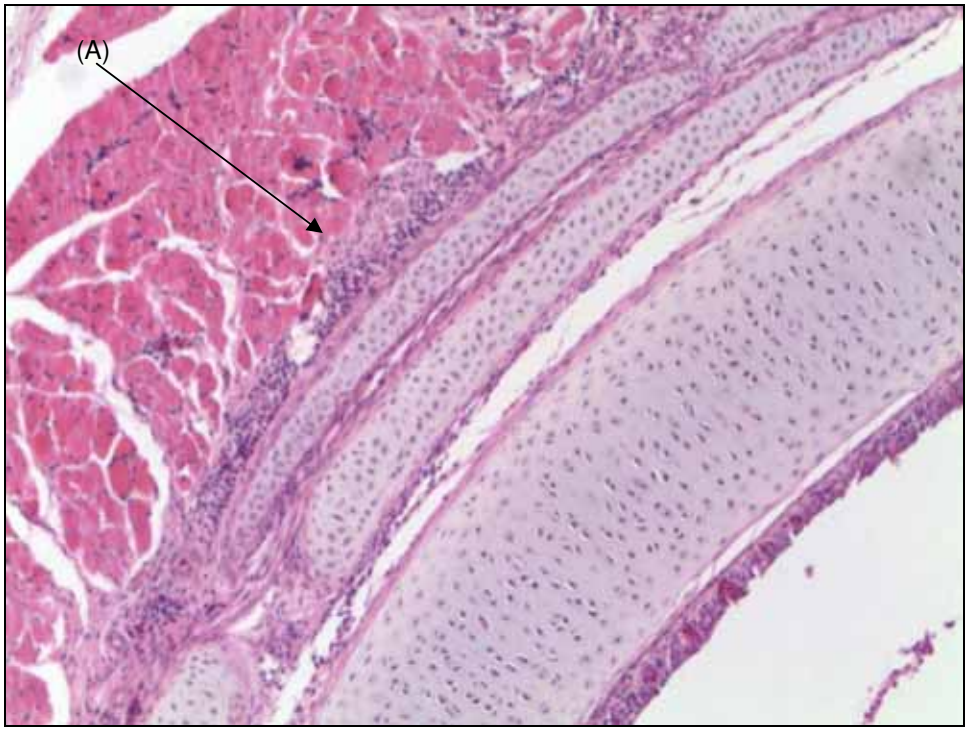


Figura 27. Fotomicrografia de traquéia de ave do grupo vacinado no primeiro dia de idade, e desafiado com o VBI aos 21 dias de idade no terceiro dia pós-infecção. HE, obj. 10x. Legendas: (A) Inflamação na túnica adventícia de escore 3.

6.3.6 Correlações

Os resultados das análises de correlação entre os diferentes ensaios realizados no Delineamento experimental I, classificados de acordo com valor do coeficiente de correlação (r) e respectivas cores relacionadas (Quadro 1), encontram-se dispostos nos (Quadros 2 e 3)

Foram confirmadas correlações positivas entre os três testes que indicam lesão na traquéia (ciliostase, histopatologia e replicação viral). Entre os achados de estase ciliar e os de expressão dos genes imuno-relacionados avaliados, foram verificadas correlações: positiva muito forte com Granzima homóloga A; positiva substancial com CD8+; positiva moderada com IL10, IL6, e IFNγ; e negativa moderada com TNF.

De forma similar, resultados entre lesões de histopatologia e expressão dos genes imuno-relacionados, houve correlação positiva substancial com CD8+ e

Granzima homóloga A; positiva moderada com IL10, IL6 e IFNγ; e correlação negativa moderada com TNF.

Na comparação entre os resultados de expressão dos genes imune-relacionados, foi verificada correlação positiva muito forte entre: TGF e TNF, IL6 e IL10, IL6 e IFNγ, IL1β e IFNγ, CD8+ e Granzima homóloga A; correlação positiva substancial entre: TGF e IL1β, TNF e IL1β, IL10 e IL1β, IL10 e IFNγ, IL6 e IL1β, IL6 e CD8+, IL6 e Granzima homóloga A, IFNγ e CD8+, IFNγ e Granzima homóloga A; e correlação positiva moderada entre: TGF e IL10, TGF e IL6, TGF e IFNγ, IL10 e CD8+, IL10 e Granzima homóloga A, IL1β e CD8+, IL1β e Granzima homóloga A.

Os resultados de replicação viral apresentaram correlação positiva substancial com os achados de estase ciliar e expressão de IL6; e correlação positiva moderada com lesões de histopatologia e expressão de IL10, IL1β, IFNγ e Granzima homóloga A.

Em relação às correlações entre os resultados de mensuração de anticorpos anti-VBI na lágrima e no soro, e os de lesões traqueais, foram observadas correlações negativas muito fortes entre a replicação do VBI e a mensuração de IgG e IgM na lágrima; e correlações positivas muito fortes entre a produção de IgA e IgG, e entre IgM e IgG, somente na lágrima (Quadro 3).

Quadro 2. Correlação entre os resultados obtidos da mensuração dos diferentes isótipos (IgA, IgG e IgM) de anticorpos anti-VBI em relação aos ensaios de avaliação da ciliostase, a magnitude das alterações histopatológicas e a replicação viral, das amostras de lágrima e de soro provenientes das aves do Delineamento experimental I (intervalo de 7dpi), infectadas com o VBI, previamente vacinadas ou não.

	IgA S	**IgG L**	**IgG S**	**IgM L**	**IgM S**	**C**	**H**	**VBI**
IgA L	N	0,7091 [a] *	N	N	N	N	N	N
IgA S		N	N	N	N	N	N	N
IgG L			N	0,7576 *	N	N	N	-0,7212 *
IgG S				N	N	N	N	N
IgM L					N	N	N	-0,7818 *
IgM S						N	N	N

S= Soro; L=Lágrima; C = Avaliação da estase ciliar; H = Avaliação de lesões de histopatologia; VBI = Replicação viral (bronquite infecciosa); N = Não houve correlaçã0; *** = P<0,001; ** = P<0,005; *=P<0,01; a = Coeficiente de correlação - Spearman

Quadro 3. Correlação entre os resultados obtidos da quantificação da expressão dos genes imune-relacionados, de avaliação da ciliostase, de histopatologia e replicação viral, das amostras de traquéia provenientes das aves do Delineamento experimental I, infectadas com o VBI, previamente vacinadas ou não.

	TNF	**IL10**	**IL6**	**IL1β**	**IFNγ**	**CD8+**	**GraA**	**C**	**H**	**VBI**
TGF	0,7065 [a] ***	0,4533 **	0,3433 *	0,6614 ***	0,4133 **	NS	NS	NS	NS	NS
TNF		NS	NS	0,5914 ***	NS	NS	NS	-0,3041 *	-0,3818 **	NS
IL10			0,7871 ***	0,6748 ***	0,6567 ***	0,3983 **	0,4010 **	0,3119 *	0,4265 **	0,4391 **
IL6				0,6376 ***	0,7511 ***	0,5782 ***	0,5902 ***	0,4604 ***	0,3861 **	0,5909 ***
IL1β					0,7173 ***	0,4096 **	0,3913 **	NS	NS	0,3037 *
IFNγ						0,5430 ***	0,5708 ***	0,3054 *	0,3354 *	0,4929 ***
CD8+							0,8470 ***	0,6407 ***	0,5634 ***	NS
GraA								0,7710 ***	0,6572 ***	0,3173 *
C									0,7606 ***	0,5396 ***
H										0,4793 ***
VBI										

GraA = Granzima homologa A; C = Avaliação da estase ciliar; H = Avaliação de lesões de histopatologia; VBI = Replicação viral (bronquite infecciosa); NS = Correlação não significativa; *** = P<0,001; ** = P<0,005; *=P<0,01; a = Coeficiente de correlação - Spearman

6.4 Delineamento experimental II: avaliação comparativa entre dose vacinal e indução de respostas imunes e de proteção efetiva contra o VBI

6.4.1 Mensuração de anticorpos locais e sistêmicos contra o VBI

Aos 29 dias de idade das aves, foram observados aumentos nos níveis de anticorpos sistêmicos e locais anti-VBI do isótipo IgG após a vacinação no primeiro dia de idade. No entanto não houve diferença significativa entre os grupos vacinados (Figuras 28 e 29), sendo que aos cinco dias pós-infecção os níveis de IgG atingiram a sua concentração máxima, com valores significativamente maiores no grupo que recebeu dose cheia da vacina (Figura 30). Na secreção lacrimal os maiores níveis de anticorpos IgG foram alcançados com 24 hpi e com 5dpi, com valores significativamente maiores nos grupos que receberam vacina dose cheia e ½ dose vacinal, ou vacina dose cheia e ¼ dose vacinal, respectivamente (Figuras 31, 32 e 33).

Em relação aos anticorpos anti-VBI do isótipo IgM, foi observada uma elevação máxima aos 14 dias de idade em amostras de soro, em resposta à vacinação, com valores significativamente superiores no grupo que recebeu dose cheia da vacina (Figuras 34 e 35), enquanto entre as amostras de lágrima dos grupos vacinados, não apresentaram diferença significativa quanto aos níveis de anticorpos do isótipo IgM (Figura 36).

Quanto aos teores de anticorpos anti-VBI do isótipo IgA no compartimento sistêmico, houve um pico de produção aos 14 dias de idade; no entanto não foi observada diferença significativa entre os grupos com as diferentes doses de vacina testadas (Figura 37). Aos 28 dias de idade foram observados valores significativamente superiores de anticorpos anti-VBI (IgA) nas amostras de lágrima para os grupos que receberam dose cheia da vacina ou ½ dose, comparando-se ao grupo que recebeu somente ¼ da dose (Figuras 38 e 39).

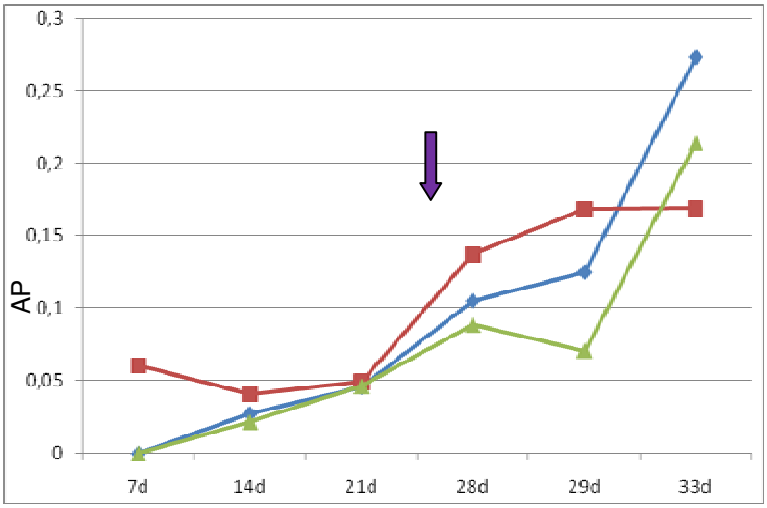


Figura 28. Perfil cinético da produção de anticorpos do isótipo IgG anti-VBI detectados pelo S-ELISA-ConA nas amostras de soro das aves do Delineamento experimental II, nos diferentes intervalos pós-vacinação (pv) ou pós-infecção (pi). Legenda: Seta roxa - dia do desafio. Linha azul – aves SPF vacinadas com estirpe H120 (dose cheia) no primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade; Linha vermelha – aves SPF vacinadas com estirpe H120 (1/2 dose) e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade; Linha verde – aves SPF vacinadas com estirpe H120 (1/4 dose) e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade.

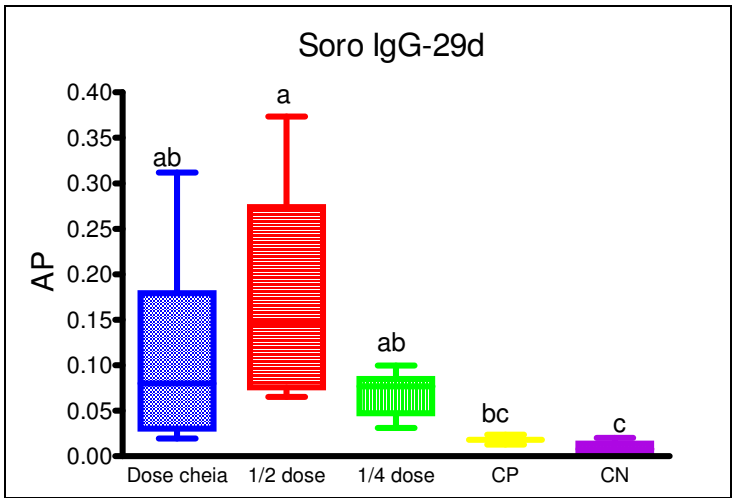


Figura 29. Comparação entre os níveis de anticorpos do isótipo IgG nas amostras de soro das aves do Delineamento experimental II aos 29 dias de idade (24hpi). Legenda: Barras azuis – aves vacinadas com estirpe H120 (dose cheia) no primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade; Barras vermelhas - aves vacinadas com estirpe H120 (1/2 dose) no primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade; Barras verdes - aves vacinadas com estirpe H120 (1/4 dose) no primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade; Barras amarelas - aves não vacinadas e desafiadas aos 28 dias de idade (Controle positivo da infecção – CP); Barras roxas – aves não vacinadas e não desafiadas (Controle negativo da infecção - CN). Estão indicados na figura mediana e desvio padrão da média. (a,b,c) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

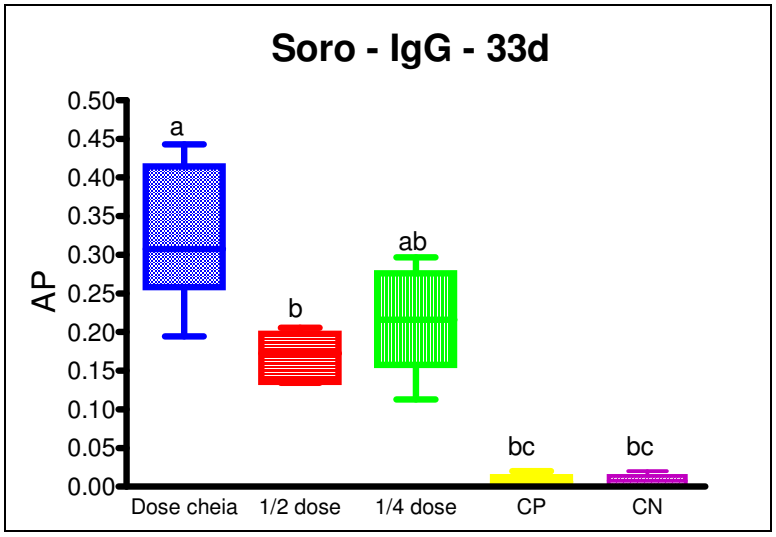


Figura 30. Comparação entre os níveis de anticorpos do isótipo IgG nas amostras de soro das aves do Delineamento experimental II aos 33 dias de idade (5dpi). Legenda: Barras azuis – aves vacinadas com estirpe H120 (dose cheia) no primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade; Barras vermelhas - aves vacinadas com estirpe H120 (1/2 dose) no primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade; Barras verdes - aves vacinadas com estirpe H120 (1/4 dose) no primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade; Barras amarelas - aves não vacinadas e desafiadas aos 28 dias de idade (Controle positivo da infecção – CP); Barras roxas – aves não vacinadas e não desafiadas (Controle negativo da infecção - CN). Estão indicados na figura mediana e desvio padrão da média. (a,b,c) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

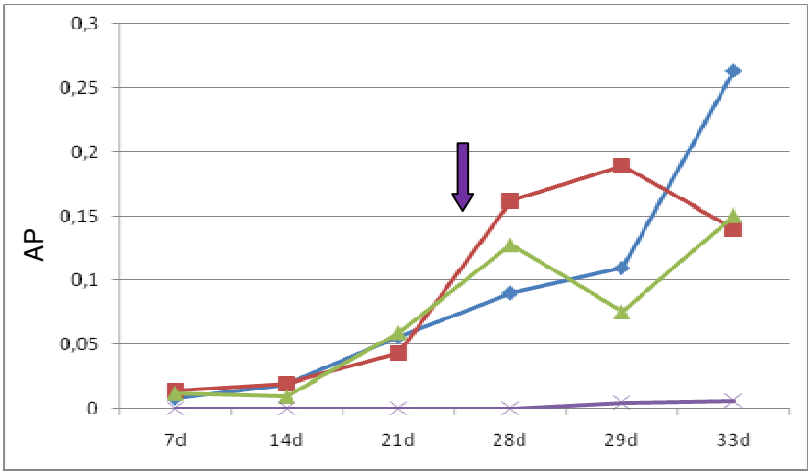


Figura 31. Perfil cinético da produção de anticorpos do isótipo IgG anti-VBI detectados pelo S-ELISA-ConA nas amostras de lágrima das aves do Delineamento experimental II, nos diferentes intervalos pós-vacinação (pv) ou pós-infecção (pi). Legenda: Seta roxa - dia do desafio. Linha azul – aves SPF vacinadas com estirpe H120 (dose cheia) no primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade; Linha vermelha – aves SPF vacinadas com estirpe H120 (1/2 dose) e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade; Linha verde – aves SPF vacinadas com estirpe H120 (1/4 dose) e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade.

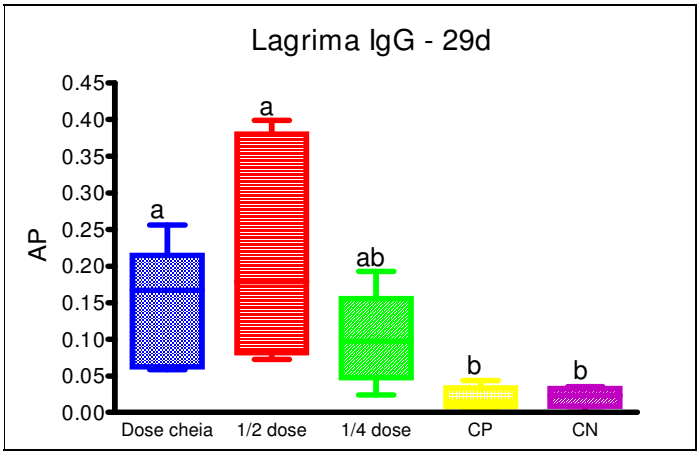


Figura 32. Comparação entre os níveis de anticorpos do isótipo IgG nas amostras de lágrima das aves do Delineamento experimental II aos 29 dias de idade (24hpi). Legenda: Barras azuis – aves vacinadas com estirpe H120 (dose cheia) no primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade; Barras vermelhas - aves vacinadas com estirpe H120 (1/2 dose) no primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade; Barras verdes - aves vacinadas com estirpe H120 (1/4 dose) no primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade; Barras amarelas - aves não vacinadas e desafiadas aos 28 dias de idade (Controle positivo da infecção – CP); Barras roxas – aves não vacinadas e não desafiadas (Controle negativo da infecção - CN). Estão indicados na figura, mediana e desvio padrão da média. (a,b,c) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

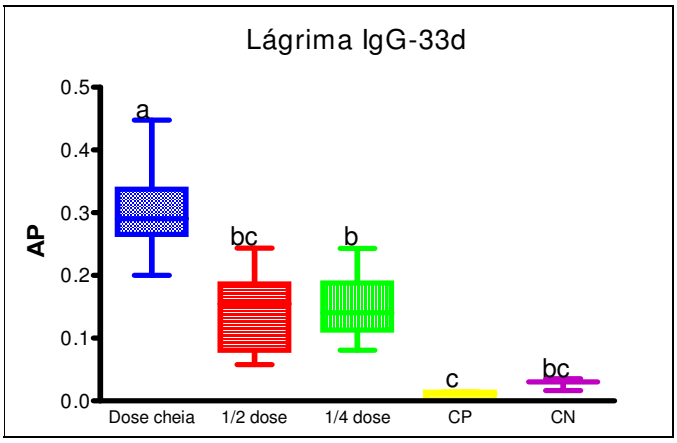


Figura 33. Comparação entre os níveis de anticorpos do isótipo IgG nas amostras de lágrima das aves do Delineamento experimental II aos 29 dias de idade (24hpi). Legenda: Barras azuis – aves vacinadas com estirpe H120 (dose cheia) no primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade; Barras vermelhas - aves vacinadas com estirpe H120 (1/2 dose) no primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade; Barras verdes - aves vacinadas com estirpe H120 (1/4 dose) no primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade; Barras amarelas - aves não vacinadas e desafiadas aos 28 dias de idade (Controle positivo da infecção – CP); Barras roxas – aves não vacinadas e não desafiadas (Controle negativo da infecção - CN). Estão indicados na figura, mediana e desvio padrão da média. (a,b,c) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

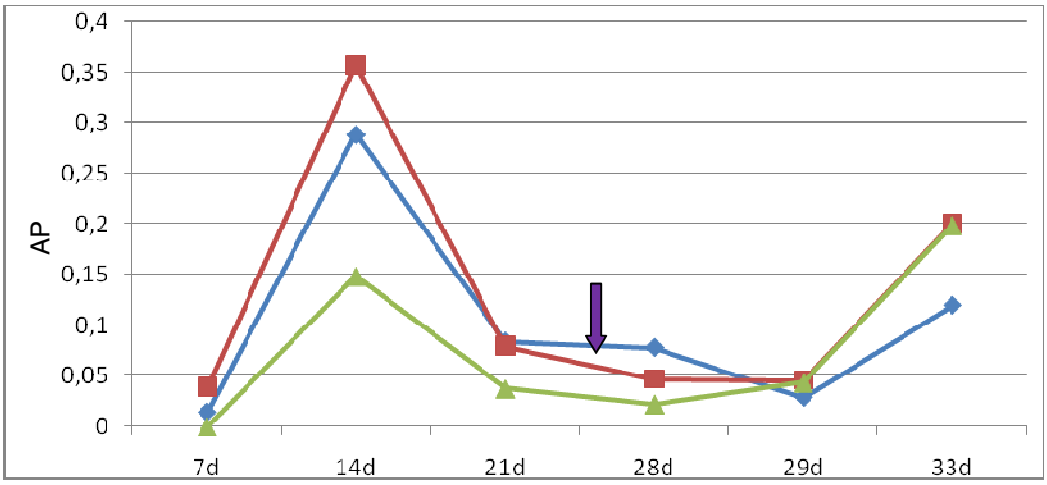


Figura 34. Perfil cinético da produção de anticorpos do isótipo IgM anti-VBI detectados pelo S-ELISA-ConA nas amostras de soro das aves do Delineamento experimental II, nos diferentes intervalos pós-vacinação (pv) ou pós-infecção (pi). Legenda: Seta roxa - dia do desafio. Linha azul – aves SPF vacinadas com estirpe H120 (dose cheia) no primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade; Linha vermelha – aves SPF vacinadas com estirpe H120 (1/2 dose) e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade; Linha verde – aves SPF vacinadas com estirpe H120 (1/4 dose) e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade.

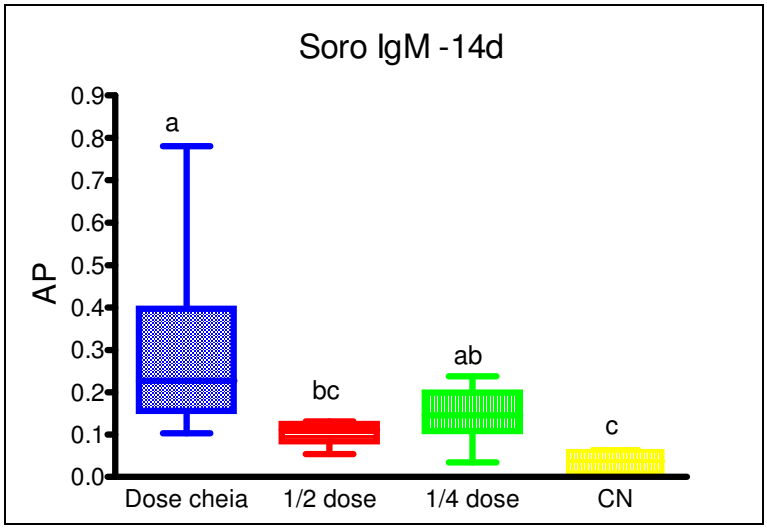


Figura 35. Comparação entre os níveis de anticorpos do isótipo IgM nas amostras de soro das aves do Delineamento experimental II aos 14 dias de idade. Legenda: Barras azuis – aves vacinadas com estirpe H120 (dose cheia) no primeiro dia de idade; Barras vermelhas - aves vacinadas com estirpe H120 (1/2 dose) no primeiro dia de idade; Barras verdes - aves vacinadas com estirpe H120 (1/4 dose) no primeiro dia de idade; Barras amarelas - aves não vacinadas (Controle negativo- CN). Estão indicados na figura, mediana e desvio padrão da média. (a,b,c) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

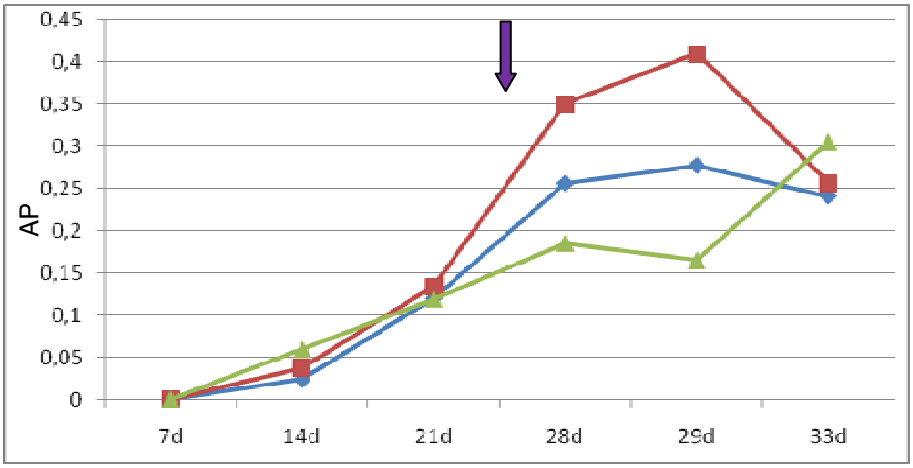


Figura 36. Perfil cinético da produção de anticorpos do isótipo IgM anti-VBI detectados pelo S-ELISA-ConA nas amostras de lágrima das aves do Delineamento experimental II, nos diferentes intervalos pós-vacinação (pv) ou pós-infecção (pi). Legenda: Seta roxa - dia do desafio. Linha azul – aves SPF vacinadas com estirpe H120 (dose cheia) no primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade; Linha vermelha – aves SPF vacinadas com estirpe H120 (1/2 dose) e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade; Linha verde – aves SPF vacinadas com estirpe H120 (1/4 dose) e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade.

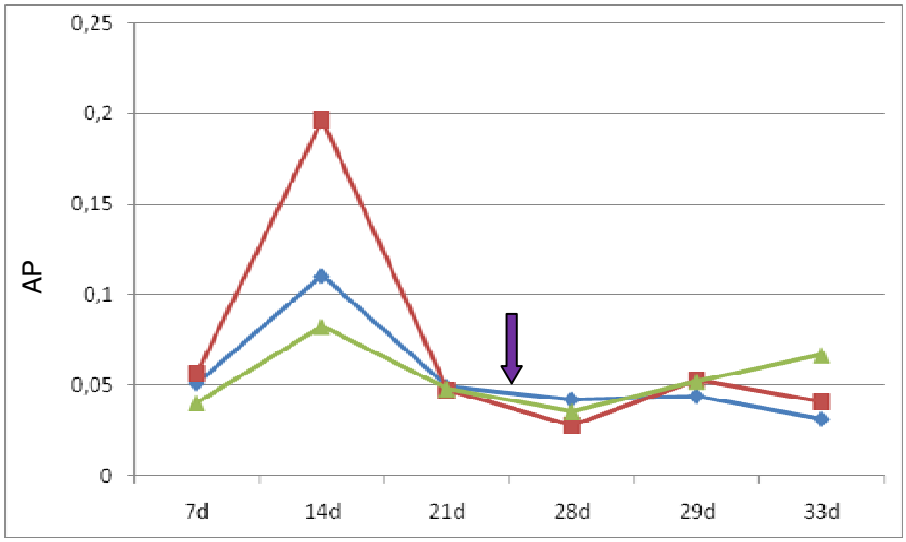


Figura 37. Perfil cinético da produção de anticorpos do isótipo IgA anti-VBI detectados pelo S-ELISA-ConA nas amostras de soro das aves do Delineamento experimental II, nos diferentes intervalos pós-vacinação (pv) ou pós-infecção (pi). Legenda: Seta roxa - dia do desafio. Linha azul – aves SPF vacinadas com estirpe H120 (dose cheia) no primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade; Linha vermelha – aves SPF vacinadas com estirpe H120 (1/2 dose) e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade; Linha verde – aves SPF vacinadas com estirpe H120 (1/4 dose) e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade.

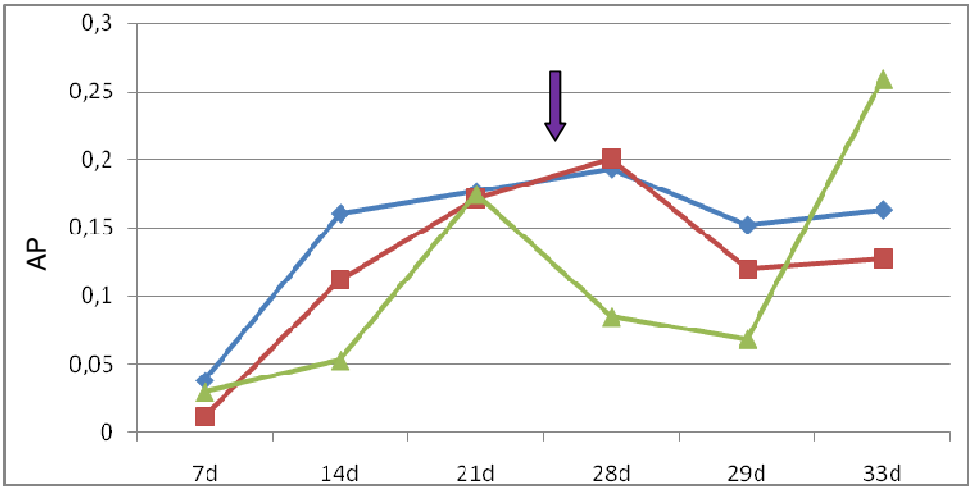


Figura 38. Perfil cinético da produção de anticorpos do isótipo IgA anti-VBI detectados pelo S-ELISA-ConA nas amostras de lágrima das aves do Delineamento experimental II, nos diferentes intervalos pós-vacinação (pv) ou pós-infecção (pi). Legenda: Seta roxa - dia do desafio. Linha azul – aves SPF vacinadas com estirpe H120 (dose cheia) no primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade; Linha vermelha – aves SPF vacinadas com estirpe H120 (1/2 dose) e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade; Linha verde – aves SPF vacinadas com estirpe H120 (1/4 dose) e desafiadas com estirpe M41 aos 28 dias de idade.

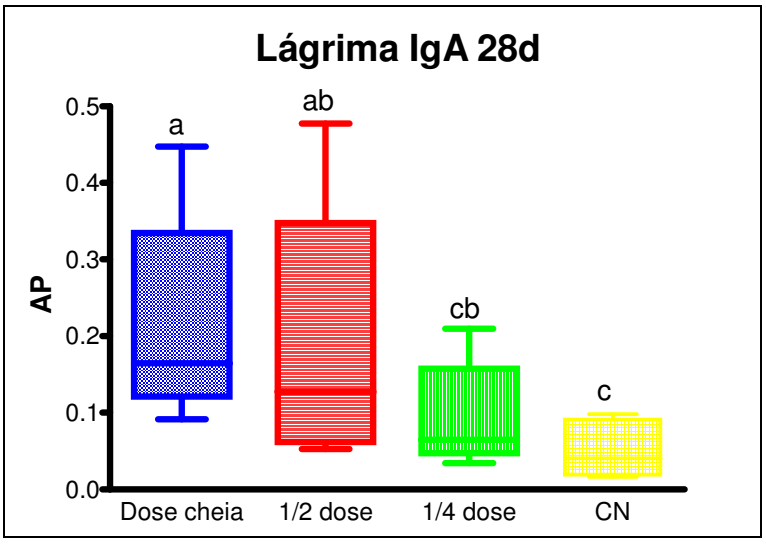


Figura 39. Comparação entre os níveis de anticorpos do isótipo IgA nas amostras de lágrima das aves do Delineamento experimental II aos 28 dias de idade. Legenda: Barras azuis – aves vacinadas com estirpe H120 (dose cheia) no primeiro dia de idade; Barras vermelhas - aves vacinadas com estirpe H120 (1/2 dose) no primeiro dia de idade; Barras verdes - aves vacinadas com estirpe H120 (1/4 dose) no primeiro dia de idade; Barras amarelas - aves não vacinadas (Controle negativo- CN). Estão indicados na figura, mediana e desvio padrão da média. (a,b,c) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

6.4.2 Quantificação relativa da expressão de genes relacionados às respostas imunes

Em relação aos resultados de expressão do gene codificador do marcador de linfócito T citotóxico CD8+, foram observados maiores valores no intervalo de 24hpi em aves dos grupos previamente vacinados, sendo que o grupo que recebeu dose cheia da vacina apresentou valores significativamente aumentados em relação ao grupo que recebeu ¼ da dose e do controle positivo da infecção. No quinto dia pós-infecção houve redução a praticamente zero da expressão desse marcador nos grupos previamente vacinados, e aumento significativo no grupo controle positivo da infecção (Figura 40).

De forma similar ao perfil de expressão de CD8+, ocorreu com a expressão do gene codificador da Granzima homóloga A, a qual se apresentou significativamente aumentada nos grupos vacinados comparados ao grupo Controle positivo da infecção (CP), e ao quinto dia pós-infecção houve redução da expressão desse gene nas aves vacinadas, com aumento significativo do grupo CP (Figura 41).

O perfil de produção de RNAm de IFNγ apresentou-se também semelhante ao observado para Granzima homóloga A e para o CD8+, revelando um aumento mais acentuado de produção no grupo vacinado com dose cheia no intervalo de 24hpi, o qual diferiu significativamente da produção do grupo CP, cuja expressão foi aumentada de forma mais proeminente somente no quinto dia pós-infecção (Figura 42).

No intervalo de 24hpi houve diferença significativa da expressão de IL1β entre o grupo que recebeu ¼ da dose vacinal e o CP, no entanto entre os grupos vacinados (com as diferentes doses) não houve diferença significativa, sendo que aos cinco dpi, somente os grupos que receberam dose cheia ou ½ dose apresentaram níveis de expressão gênica dessa citocina significativamente inferiores ao grupo CP (Figura 43).

Apesar de os maiores valores de expressão gênica de IL6 e TNF terem sido observados aos cinco dpi, especialmente no grupo controle negativo de aves não vacinadas (CP), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos diferentes intervalos pós-infecção avaliados (Figuras 44 e 46).

Em relação à quantificação da expressão gênica de IL10, no intervalo de 24hpi, os níveis de expressão no grupo que recebeu dose cheia da vacina apresentaram-se

significativamente superiores em relação ao grupo que recebeu ½ dose e ao grupo CP. Entretanto aos 5dpi não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figura 45).

A expressão de TGF não apresentou diferença significativa entre os grupos avaliados no intervalo de 24hpi, sendo que aos cinco dpi houve diferença significativa entre a expressão dessa citocina nos grupos vacinados com dose cheia ou ½ dose e o grupo controle positivo da infecção (Figura 47).

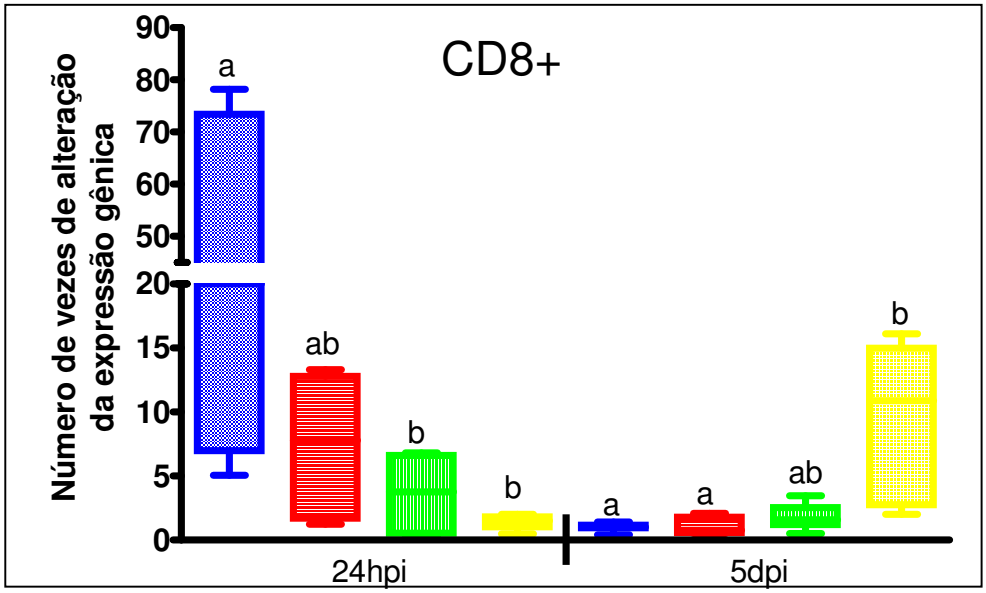


Figura 40. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador do marcador de linfócito T citotóxico CD8+ (CD8+), das aves dos grupos vacinados com: Dose cheia (barras azuis), ½ dose (barras vermelhas), ¼ dose (barras verdes); e do grupo infectado e não vacinado (CP – Controle positivo da infecção) (barras amarelas), nos diferentes intervalos pós-desafio (24hpi e 5dpi). Estão indicados na figura mediana e desvio padrão da média. (a,b) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, para cada intervalo avaliado ($p < 0,05$).

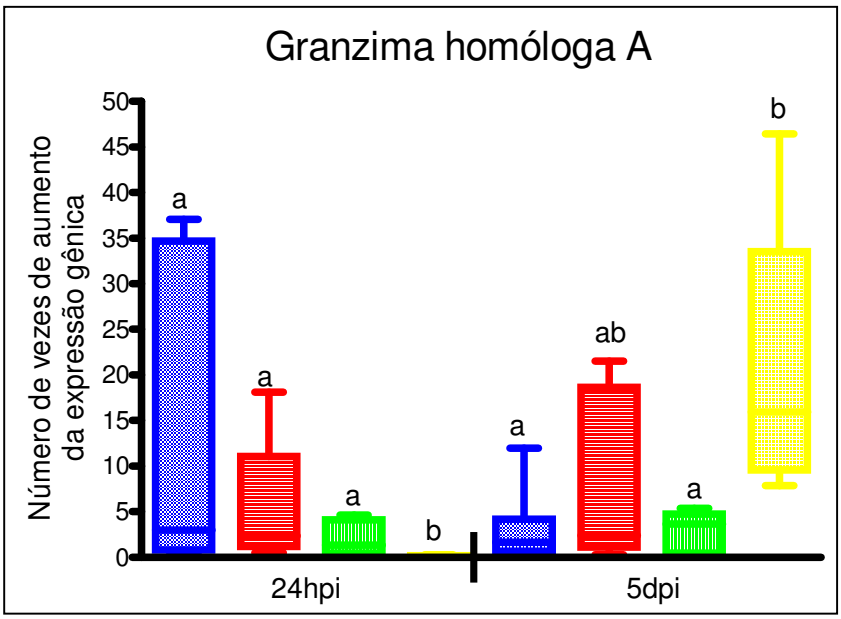


Figura 41. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador da Granzima homóloga A (GraA), das aves dos grupos vacinados com: dose cheia (barras azuis), ½ dose (barras vermelhas), ¼ dose (barras verdes); e do grupo infectado e não vacinado (CP – Controle positivo da infecção) (barras amarelas), nos diferentes intervalos pós-desafio (24hpi e 5dpi). Estão indicados na figura, mediana e desvio padrão da média. (a,b) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

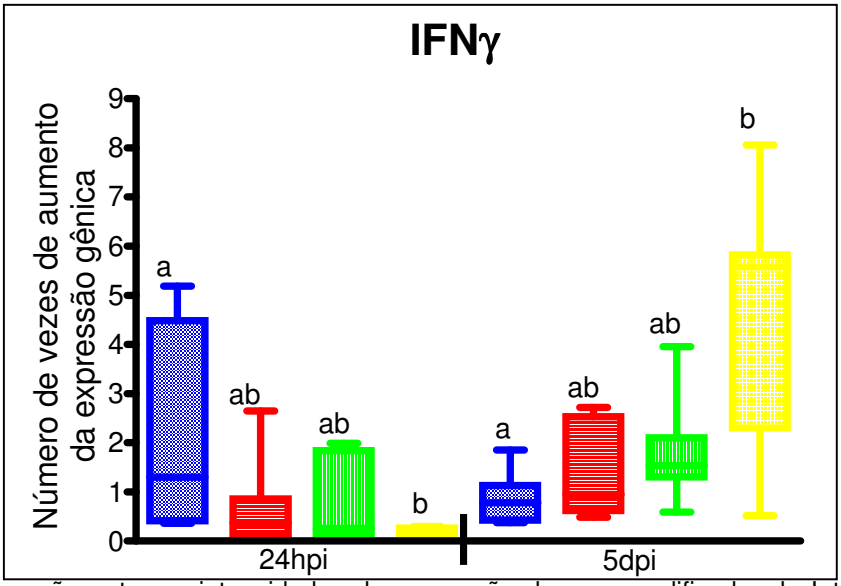


Figura 42. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador do Interferon gamma (IFNγ), das aves dos grupos vacinados com: Dose cheia (barras azuis), ½ dose (barras vermelhas), ¼ dose (barras verdes); e do grupo infectado e não vacinado (CP – Controle positivo da infecção) (barras amarelas), nos diferentes intervalos pós-desafio (24hpi e 5dpi). Estão indicados na figura, mediana e desvio padrão da média. (a,b) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

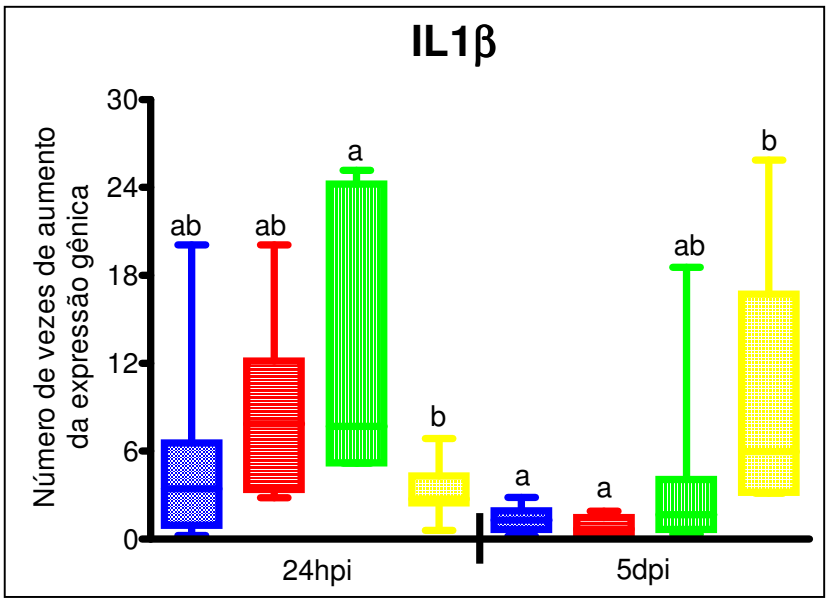


Figura 43. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador da Interleucina 1 beta (IL1β), das aves dos grupos vacinados com: Dose cheia (barras azuis), ½ dose (barras vermelhas), ¼ dose (barras verdes); e do grupo infectado e não vacinado (CP – Controle positivo da infecção) (barras amarelas), nos diferentes intervalos pós-desafio (24hpi e 5dpi). Estão indicados na figura, mediana e desvio padrão da média. (a,b) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

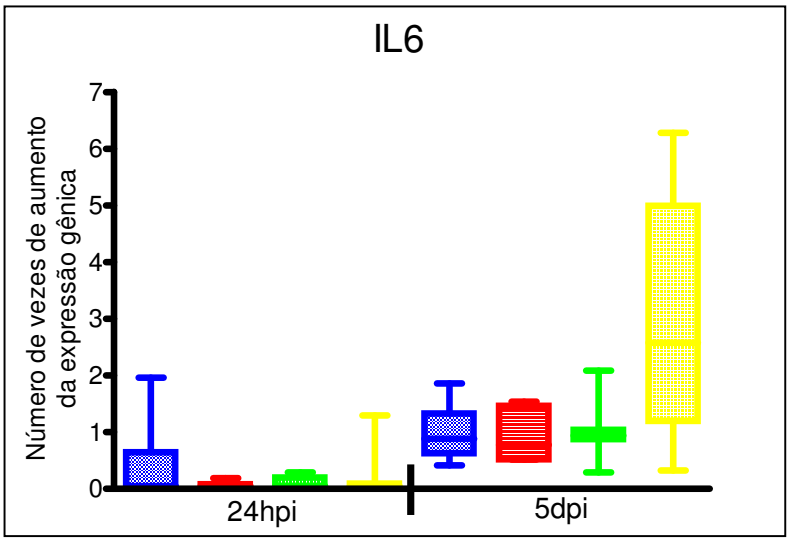


Figura 44. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador da Interleucina 6 (IL6), das aves dos grupos vacinados com: Dose cheia (barras azuis), ½ dose (barras vermelhas), ¼ dose (barras verdes); e do grupo infectado e não vacinado (CP – Controle positivo da infecção) (barras amarelas), nos diferentes intervalos pós-desafio (24hpi e 5dpi). Estão indicados na figura, mediana e desvio padrão da média. Não houve diferença significativa entre os grupos avaliados pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

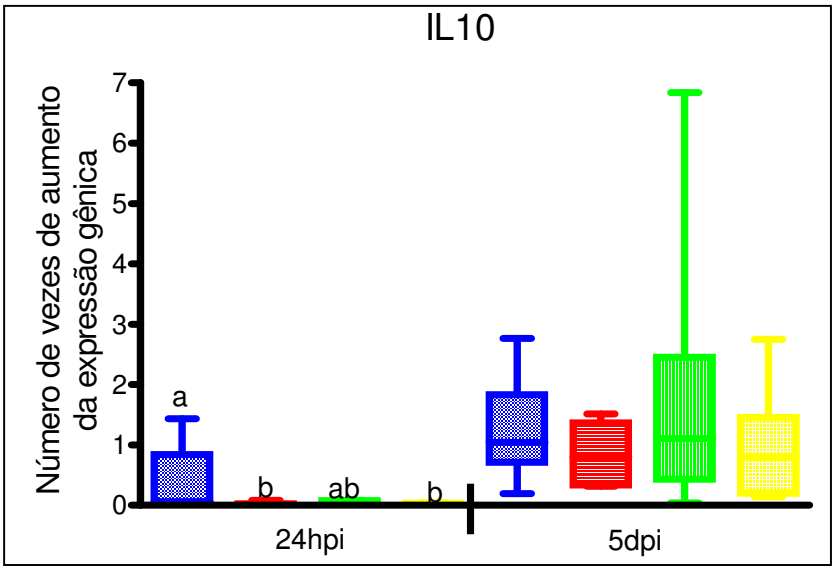


Figura 45. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador da Interleucina 10 (IL10), das aves dos grupos vacinados com: Dose cheia (barras azuis), ½ dose (barras vermelhas), ¼ dose (barras verdes); e do grupo infectado e não vacinado (CP – Controle positivo da infecção) (barras amarelas), nos diferentes intervalos pós-desafio (24hpi e 5dpi). Estão indicados na figura, mediana e desvio 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 intervalo de 24hpi. No intervalo de 5dpi não houve diferença significativa entre os grupos avaliados.

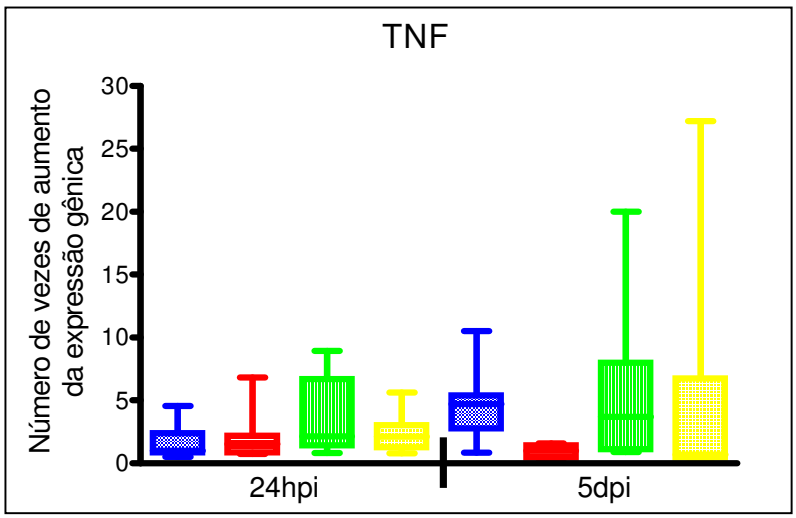


Figura 46. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador do Fator de necrose tumoral (TNF), das aves dos grupos vacinados com: Dose cheia (barras azuis), ½ dose (barras vermelhas), ¼ dose (barras verdes); e do grupo infectado e não vacinado (CP – Controle positivo da infecção) (barras amarelas), nos diferentes intervalos pós-desafio (24hpi e 5dpi). Estão indicados na figura, mediana e desvio padrão da média Não houve diferença significativa entre os grupos avaliados pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

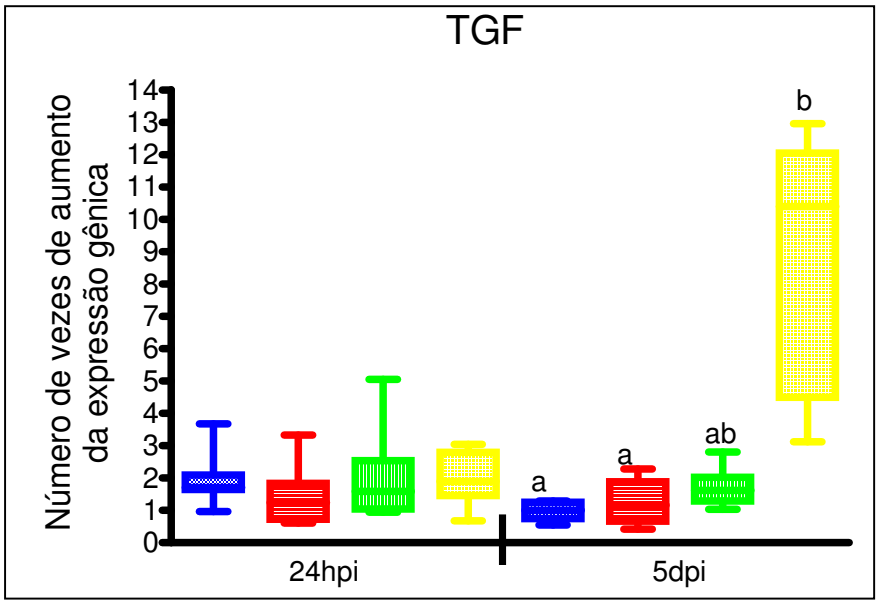


Figura 47. Comparação entre as intensidades da expressão do gene codificador do Fator de crescimento de transformação (TGF), das aves dos grupos vacinados com: Dose cheia (barras azuis), ½ dose (barras vermelhas), ¼ dose (barras verdes); e do grupo infectado e não vacinado (CP – Controle positivo da infecção) (barras amarelas), nos diferentes intervalos pós-desafio (24hpi e 5dpi). Estão indicados na figura, mediana e desvio padrão da média. Não houve diferença significativa entre os grupos do intervalo de 24hpi. (a,b) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$) para o intervalo de 5dpi.

6.4.3 Quantificação absoluta da replicação viral

No intervalo de 24hpi houve detecção do VBI em duas aves do grupo vacinado com dose cheia (n=7), uma ave do grupo vacinado com ½ dose (n=7), uma ave do grupo vacinado com ¼ da dose (n=7), e em duas aves do grupo CP (n=9). Aos cinco dias pós-infecção, todas as aves de todos os grupos apresentaram-se positivas para detecção do VBI, conforme demonstram os resultados da RT-PCR quantitativa em tempo real. No entanto, a carga viral, que indica a intensidade da replicação do VBI observada no grupo controle de aves não vacinadas (CP foi significativamente superior em relação aos grupos de aves vacinadas (Figura 48).

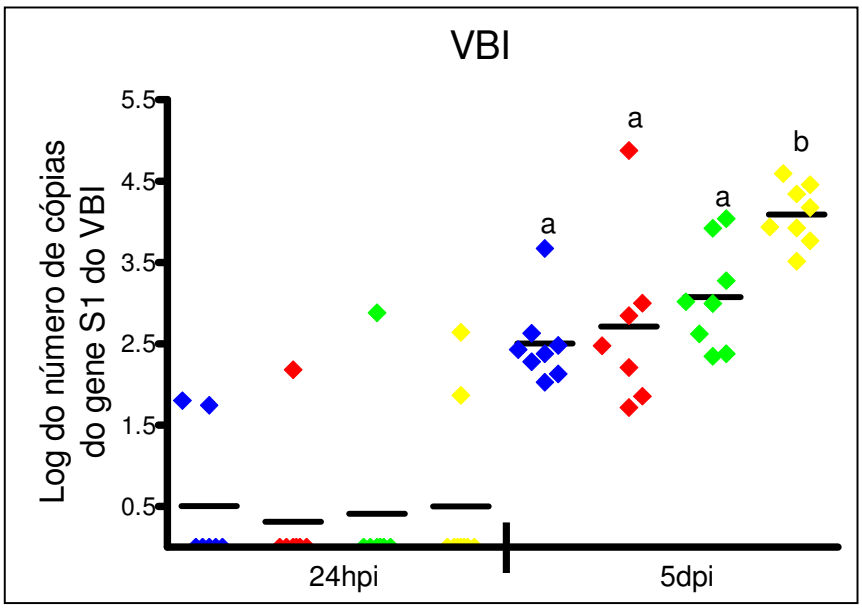


Figura 48. Número de cópias do gene S1 do VBI (Log10) detectados nas aves dos grupos desafiados: vacinado com dose cheia (azul), vacinado com ½ dose (vermelho), vacinado com ¼ da dose (verde); e infectado e não vacinado (amarelo), nos diferentes intervalos de 24 h e 5 d pós-desafio. Estão indicados na figura, mediana (barras pretas). Não houve diferença significativa entre os grupos do intervalo de 24 hpi. (a,b) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, para o intervalo de 5 dpi ($p < 0,05$).

6.4.4 Avaliação da ciliostase

Não foram observadas alterações no movimento ciliar da traquéia em nenhum dos grupos no intervalo de 24 horas pós-infecção (Tabela 4 e Figura 49).

No quinto dia pós-infecção, não foram observadas diferenças significativas de escores de lesão entre os grupos imunizados com diferentes doses da vacina, apesar de terem sido observados maiores escores para o grupo vacinado com ¼ da dose. Entre os grupos vacinados, somente o que recebeu dose cheia apresentou diferença significativa em relação ao grupo de aves não vacinadas e desafiadas (CP), enquanto as demais subdosagens não apresentaram diferença significativa com relação a este mesmo grupo controle da infecção. Ademais o grupo CN apresentou diferença significativa em relação ao grupo que recebeu ¼ da dose vacinal, enquanto em relação aos grupos que receberam dose cheia ou ½ dose da vacina não houve diferença significativa (Figura 49).

Tabela 4. Avaliação do escore de inibição do movimento ciliar da traquéia (de 0 a 4) de aves do Delineamento Experimental II, vacinadas e desafiadas com o VBI.

Pi	Grupo	Escore P	Escore M	Escore D	Escore total
24h	Dose Cheia	0	0	0	0
24h	½ dose	0	0	0	0
24h	¼ dose	0	0	0	0
24h	CP	0	0	0	0
24h	CN	0	0	0	0
5d	Dose Cheia	1,13	1,13	1,13	1,13
5d	½ dose	1,29	1,29	1,43	1,33
5d	¼ dose	1,50	1,25	1,75	1,5
5d	CP	4	4	4	4
5d	CN	0	0	0	0

pi = intervalo pós-infecção; h= hora; d= dia; P= porção proximal; M= porção média; D= porção distal

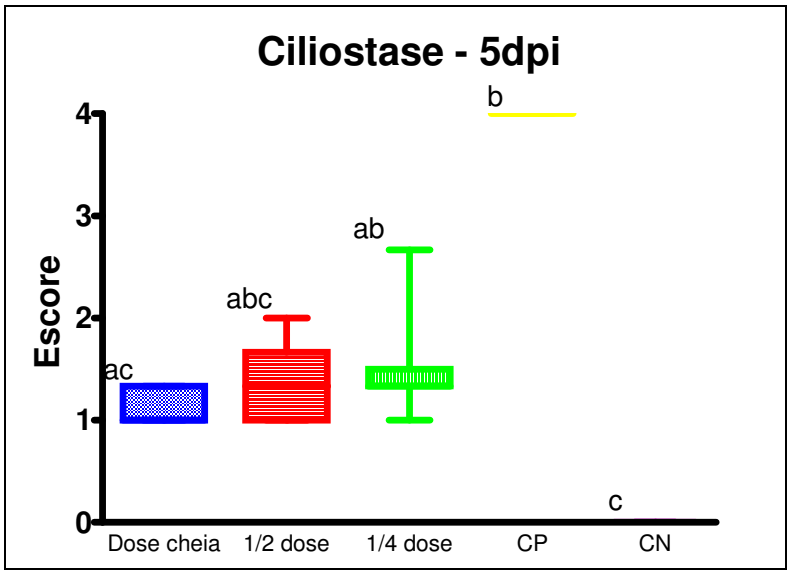


Figura 49. Comparação de escores totais de ciliostase na traquéia, no intervalo de 5 dias (d) pós-infecção (pi) das aves de cada um dos grupos experimentais do Delineamento Experimental II. Legenda: Barras azuis – aves SPF vacinadas com estirpe H120 no primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 do VBI aos 28 dias de idade. Barras vermelhas – aves SPF vacinadas com estirpe H120 (1/2 dose) no primeiro dia de idade e desafiadas aos 28 dias de idade com estirpe M41 do VBI. Barras verdes – aves SPF vacinadas com estirpe H120 (1/4 dose) no primeiro dia de idade e desafiadas com estirpe M41 do VBI aos 28 dias de idade. Barras amarelas – (CP – Controle positivo da infecção) aves SPF desafiadas aos 28 dias de idade com estirpe M41 do VBI. Barras azuis – (CN- Controle negativo) aves SPF não imunizadas e não desafiadas. . (a,b,c) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, ($p < 0,05$).

6.4.5 Histopatologia da traquéia

Os resultados da avaliação das lesões histopatológicas estão em consonância com os de estase ciliar, de forma similar ao que foi observado nos resultados obtidos no Delineamento experimental I (Figura 50).

No intervalo de 24hpi, os escores de lesão observados entre os grupos vacinados não apresentaram diferença significativa, havendo, contudo, diferença significativa entre os grupos que receberam subdosagens da vacina e os grupos controles CP e CN.

No quinto dia pós-infecção, escores de histopatologia significativamente superiores foram observados no grupo CP em relação ao grupo vacinado com dose cheia, mas não em relação aos grupos que receberam subdoses da vacina. Entre os grupos vacinados com as diferentes doses testadas, não foram observadas diferenças significativas e o grupo CN não diferiu significativamente dos grupos que receberam dose cheia e ½ dose da vacina.

Dentre as lesões avaliadas, somente uma ave do grupo CP apresentou inflamação da camada adventícia, no quinto dia pós-infecção, e ao redor de 55,55% das aves desse mesmo grupo apresentaram hiperplasia epitelial, enquanto que nos demais grupos esses tipos de lesões não foram observadas.

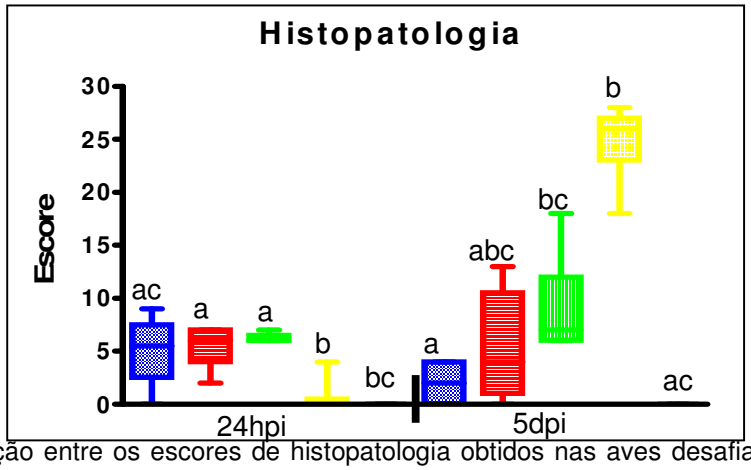


Figura 50. Comparação entre os escores de histopatologia obtidos nas aves desafiadas e previamente vacinadas com diferentes doses (Dose cheia – barras azuis, ½ dose – barras vermelhas e ¼ dose – barras verdes) e nas aves desafiadas e não vacinadas (CP=Controle Positivo da Infecção – barras amarelas), e aves do grupo controle negativo da Infecção (CN). Estão indicados na figura, mediana e desvio padrão da média. (a,b,c) Diferenças significativas pelo teste de Kruskal - Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, para cada intervalo avaliado ($p < 0,05$).

6.4.6 Correlações

Com relação aos parâmetros usados para avaliar as alterações patológicas traqueais foram obtidas correlações positivas para todos eles combinados dois a dois (ciliostase e histopatologia; ciliostase e replicação viral; histopatologia e replicação viral), conforme classificação de grau de correlação pré-estabelecido no Quadro 4.

Em relação aos resultados de ciliostase e de imunidade humoral, foram observadas correlações negativas substanciais com os níveis de anticorpos do isótipo IgA lacrimal, do isótipo IgG lacrimal / sistêmica (S); e correlação negativa moderada com o isótipo IgM lacrimal (Quadro 5).

Somente em relação aos níveis de anticorpos anti-VBI do isótipo IgG, ou lacrimal ou sistêmica foi verificada correlação negativa susbstancial com histopatologia. Já, com respeito à replicação viral foi obtica correlação negativa substancial com os anticorpos IgG da secreção lacrimal e negativa moderada com os anticorpos IgA da secreação lacrimal (Quadro 5).

Foram observadas, ainda, correlações positivas entre os níveis dos diferentes isótipos de anticorpos presentes na lágrima e/ou no soro, exceto para o isótipo IgM no soro (Quadro 5).

Em relação aos resultados de estase ciliar, somente no intervalo de 5dpi puderam ser calculadas as correlações em relação à quantificação da expressão de genes imuno-relacionados, pois no intervalo de 24hpi todos os escores de ciliostase foram iguais a zero, tendo sido verificada apenas uma correlação positiva moderada com a expressão gênica de TGF (Quadro 7).

Na comparação entre os achados de histopatologia e os de expressão dos genes imuno-relacionados avaliados, foram observadas correlações positivas com CD8+ e Granzima homóloga A no intervalo de 24hpi; e com TGF e IFNγ no intervalo de 5dpi (Quadros 6 e 7).

Quanto à replicação viral, no intervalo de 24hpi foram verificadas correlações negativas moderadas com a quantificação de RNAm de TNF e de IL1β, e positiva substancial com IL6. Enquanto que aos 5dpi, foram observadas correlações positivas substanciais da intensidade de replicação do VBI com a expressão dos genes TGF, IL6,

IFN, CD8+ e Granzima homóloga A, e positiva moderada com a expressão do gene IL10 (Quadros 6 e 7).

No intervalo de 24hpi, foram observadas correlações positivas, variando de muito forte a substanciais, entre as expressões dos genes CD8+, Granzima homóloga A e IFNγ, sendo que a expressão de IL1β apresentou-se estreitamente correlacionada com esses três genes. Em relação ao grupo de citocinas com atividades pró-inflamatórias (IL1β, IL6 e TNF), ou, ao contrário, com atividades anti-inflamatórias (TGF e IL10), foram observadas correlações, ou positivas muito fortes entre as quantificações de TNF e TGF, ou positivas substanciais entre IL6 e IL10, e entre IL1β e TNF. Ademais, nesse mesmo intervalo, foram observadas correlações positivas moderadas entre IFNγ e IL6, e IFNγ e IL10 (Quadro 6).

Aos 5dpi, os resultados de replicação viral apresentaram correlações positivas significativas com a expressão de todos os genes imuno-relacionados mensurados, com exceção de TNF, enquanto os de estase ciliar apresentaram correlação positiva somente com a mensuração de TGF RNAm, e os de histopatologia apresentaram correlações com a expressão de TGF e de IFNγ (Quadro 7).

Entre os resultados de expressão dos genes de imune-resposta, no quinto dia pós-desafio, foram observadas correlações positivas entre a maioria dos marcadores avaliados, seja entre os relacionados a respostas pró-inflamatórias (IL1β, IL6 e TNF), ou, ao contrário anti-inflamatórias (TGF e IL10), ou entre os genes relacionados à atividade citotóxica anti-viral (Granzima homóloga A, marcador de linfócito T CD8+ e IFNγ), ou mesmo entre os relacionados à resposta inflamatória e os de atividade anti-viral (Quadro 7).

Com intuito de verificar se a memória imunológica em resposta à vacinação no primeiro dia de idade conferiu um maior estado de proteção frente ao desafio com o VBI, as alterações patológicas na traquéia observadas aos 5dpi foram correlacionadas com a expressão de genes imune-relacionados no primeiro dia pós-desafio (Quadro 8). Nessa avaliação, foram observadas correlações negativas substanciais entre a expressão de Granzima homóloga A e os parâmetros de ciliostase, histopatologia e

replicação viral; correlações negativas substanciais entre histopatologia e expressão de IFNγ e CD8+; e correlação negativa moderada entre ciliostase e quantificação de RNAm de IL10.

Quadro 4. Correlação entre os resultados obtidos de avaliação da ciliostase, de histopatologia e replicação viral, das amostras de traquéia provenientes das aves do Delineamento experimental II, infectadas com o VBI, previamente vacinadas ou não.

	H	VBI
C	0,5759 [a] ***	0,8641 ***
H		0,4834 ***

C = Avaliação da estase ciliar; H = Avaliação de lesões de histopatologia; VBI = Replicação viral (bronquite infecciosa); *** = P<0,001; ** = P<0,005; *=P<0,01; a = Coeficiente de correlação - Spearman

Quadro 5. Correlação entre os resultados obtidos da mensuração dos diferentes isótipos (IgA, IgG e IgM) de anticorpos anti-VBI, em relação aos ensaios de avaliação da ciliostase, a magnitude das alterações histopatológicas e a replicação viral, das amostras de lágrima e de soro provenientes das aves do Delineamento experimental II (intervalo de 5dpi), infectadas com o VBI, previamente vacinadas ou não.

	IgA S	**IgG L**	**IgG S**	**IgM L**	**IgM S**	**C**	**H**	**VBI**
IgA L	0,6679 [a] ***	0,7033 ***	0,7065 ***	0,6132 ***	N	-0,5590 **	-0,4704 *	-0,4240 *
IgA S		0,5650 ***	0,6779 ***	0,5189 **	0,4487 *	N	N	N
IgG L			0,8562 ***	0,5153 **	N	-0,6663 ***	-0,6163 ***	-0,6396 ***
IgG S				0,4509 *	N	-0,5910 ***	-0,5410 **	-0,4663 **
IgM L					0,5418 **	-0,3915 *	N	-0,3666 *
IgM S						N	N	N

S= Soro; L=Lágrima; C = Avaliação da estase ciliar; H = Avaliação de lesões de histopatologia; VBI = Replicação viral (bronquite infecciosa); N = Não houve correlaçã0; *** = P<0,001; ** = P<0,005; *=P<0,01; a = Coeficiente de correlação - Spearman

Quadro 6. Correlação entre os resultados obtidos da quantificação da expressão dos genes de imune-resposta, a intensidade da ciliostase, a magnitude das alterações histopatológicas e replicação viral, a partir de amostras de traquéia provenientes das aves do Delineamento experimental II (intervalo de 24hpi), infectadas com o VBI, previamente vacinadas ou não.

	TNF	**IL10**	**IL6**	**IL1β**	**IFNγ**	**CD8+**	**GraA**	**C**	**H**	**VBI**
TGF	0,7609 [a] ***	N	0,4642 **	0,3696 *	N	N	N	N	N	N
TNF		N	N	0,6161 ***	N	N	N	N	N	-0,4126 *
IL10			0,5242 **	N	0,3847 *	N	N	N	N	N
IL6				N	0,4840 **	N	N	N	N	0,5193 **
IL1β					0,3774 *	0,5013 **	0,5391 **	N	N	-0,4146 *
IFNγ						0,5842 ***	0,8039 ***	N	N	N
CD8+							0,6307 ***	N	0,4603 *	N
GraA								N	0,5634 **	N
C									N	N
H										N
VBI										

GraA = Granzima homóloga A; C = Avaliação da estase ciliar; H = Avaliação de lesões de histopatologia; VBI = Replicação viral (bronquite infecciosa); N = Não houve correlação0; *** = P<0,001; ** = P<0,005; *=P<0,01; a = Coeficiente de correlação - Spearman

Quadro 7. Correlação entre os resultados obtidos da quantificação da expressão dos genes de imune-resposta, a intensidade da ciliostase, a magnitude das alterações histopatológicas e a replicação viral, a partir de amostras de traquéia provenientes das aves do Delineamento experimental II (intervalo de 5 dpi), infectadas com o VBI, previamente vacinadas ou não.

	TNF	**IL10**	**IL6**	**IL1β**	**IFNγ**	**CD8+**	**GraA**	**C**	**H**	**VBI**
TGF	N [a]	N	0,6690 ***	0,6327 ***	0,8059 ***	0,8097 ***	0,6917 ***	0,3617 *	0,5438 **	0,5367 **
TNF		0,5181 **	0,4577 **	0,5565 **	N	N	N	N	N	N
IL10			0,7496 ***	0,7786 ***	N	0,4169 *	0,5181 **	N	N	0,4329 *
IL6				0,9052 ***	0,4051 *	0,6226 ***	0,6529 ***	N	N	0,5821 ***
IL1β					0,4281 *	0,6976 ***	0,6706 ***	N	N	0,6735 ***
IFNγ						0,7884 ***	0,6970 ***	N	0,4297 *	0,5513 **
CD8+							0,6508 ***	N	N	0,5644 ***
GraA								N	N	0,5841 ***
C									0,6683 ***	0,6300 ***
H										0,4718 **
VBI										

GraA = Granzima homóloga A; C = Avaliação da estase ciliar; H = Avaliação de lesões de histopatologia; VBI = Replicação viral (bronquite infecciosa); N = Não houve correlação; *** = P<0,001; ** = P<0,005; *=P,0,01; a = Coeficiente de correlação - Spearman

Quadro 8. Correlação entre os resultados obtidos da quantificação da expressão dos genes de imune-resposta do intervalo de 24hpi e intensidade da ciliostase, a magnitude das alterações histopatológicas e replicação viral do intervalo de 5dpi, a partir de amostras de traquéia provenientes das aves do Delineamento experimental II, infectadas com o VBI, previamente vacinadas ou não.

	C	H	VBI
TGF	N [a]	N	N
TNF	N	N	N
IL10	-0,4991 ***	N	N
IL6	N	N	N
IL1β	N	N	N
IFNγ	N	-0,5183 **	N
CD8+	N	-0,6059 ***	N
GraA	-0,5206 **	-0,6397 ***	-0,5028 **

GraA = Granzima homóloga A; C = Avaliação da estase ciliar; H = Avaliação de lesões de histopatologia; VBI = Replicação viral (bronquite infecciosa); N = Não houve correlação; *** = P<0,001; ** = P<0,005; *=P,0,01; a = Coeficiente de correlação - Spearman

7 DISCUSSÃO

Apesar da existência de inúmeros estudos sobre as respostas imunes induzidas pela infecção ou vacinação com o VBI, a base da imunidade de proteção contra esse vírus ainda não está totalmente elucidada. Dentro desse contexto, tem sido demonstrado que, na maioria das vezes, a infecção ou a vacinação com o VBI estimulam a produção de anticorpos dos isótipos IgG, IgM e IgA, tanto no compartimento sanguíneo, como no compartimento das mucosas dos tratos respiratório e uro-genital (CAVANAGH, 2007). Deve-se destacar, contudo, que além da estimulação da produção de anticorpos, são desencadeados também, em nível sistêmico e local, processos de proliferação e ativação de células T efetoras, isto é, as células TCD8+, com atividade citotóxica e as células TCD4+, com capacidade de secretarem citocinas com ações moduladoras de linfócitos T e B e que se subdividem, conforme o perfil de citocinas secretadas, nas subpopulações Th1 e Th2 (CAVANAGH, 2007; COLLISON et al., 2000; MONTASSIER, 2010).

No entanto, a maior parte dos artigos da literatura destaca que os títulos de anticorpos anti-VBI do soro sanguíneo não apresentam boa correlação com o estado de proteção ao desafio com estirpe virulenta do VBI, especialmente quando o estado de proteção é avaliado na traquéia; através da mensuração do movimento ciliar, do grau de lesões histológicas e do re-isolamento viral nesse mesmo órgão. Por outro lado, considera-se que os níveis de anticorpos presentes nas secreções mucosas estão mais envolvidos na proteção do trato respiratório e, especialmente da porta de entrada desse vírus constituída pelas células epiteliais da mucosa nasal e traqueal (CAVANAGH, 2007; MONTASSIER, 2010).

A despeito disso, persistem muitas controvérsias sobre o papel protetor efetivo desses anticorpos locais. Por exemplo, os resultados de GELB et al. (1998) sugerem que os anticorpos lacrimais produzidos após o estímulo vacinal nos tecidos linfóides da glândula de Harder e conjuntivais, não são, primariamente, responsáveis pela imunidade de proteção contra a infecção pelo VBI no trato respiratório. Já, TORO et al. (1994, 1997) evidenciaram que as aves que recebiam, por via ocular, vacina constituída pela estirpe atenuada H120 do VBI, produziam quantidades significativamente maiores de anticorpos contra o VBI da classe IgA, na secreção lacrimal, comparativamente às aves não vacinadas, tendo sido constatado, ainda, que as aves desafiadas com estirpe moderadamente atenuada desse mesmo vírus (estirpe H52), o período (ao redor do 19º dia pós-vacinação) em que os níveis de anticorpos anti-VBI da classe IgA alcançavam máxima magnitude, coincidia com um maior proteção ao desafio.

E, ainda, reforçando a tese de que os anticorpos locais exercem um papel importante na proteção contra a infecção pelo VBI vem os achados de MONDAL e NAQI (2001), que ao investigar o comportamento da imunidade em pintinhos não vacinados contra BI, mas portadores de imunidade materna local e sistêmica, constataram que apenas as aves desafiadas com um dia de idade e que portavam níveis mais elevados de imunidade materna local e sistêmica é que apresentavam uma excelente performance ao desafio; com 95% de proteção, enquanto as aves um pouco mais velhas, isto é, com sete ou mais dias de idade, cujos anticorpos locais maternos haviam declinado 50% ou mais, embora elas continuassem detentoras de altos teores de anticorpos anti-VBI no soro sanguíneo, revelaram reduzidos estados de proteção ao desafio feito com esse mesmo vírus, cujas percentagens de proteção variaram de 0 a 27% (MONTASSIER, 2010).

Além dessas controvérsias a respeito do papel dos anticorpos locais na proteção contra o VBI, há ainda uma teoria contrária a uma maior relevância do papel protetor exercido pelos anticorpos das secreções mucosas e que vem no sentido de conferir uma maior importância para a resposta imune celular e, em particular para aquela que é mediada por CTLs em aves previamente imunizadas ou não, frente à infecção com o VBI (COLLISON et al., 2000). Nesses estudos, foi observado que o início da diminuição

dos sinais clínicos e da atividade replicadora desse vírus em aves não imunes que haviam sido desafiadas, coincidia com um aumento mais pronunciado da atividade de CTLs. A par disso, foi verificado que a atividade das CTLs requer a compatibilidade de moléculas de MHC-I da célula alvo do processo de citólise com o das células responsáveis por esta atividade, no caso, as células T CD8+ CD4-. Deve-se ressaltar que todos esses experimentos foram realizados com linhagens isogênicas de galinhas, que são muito diferentes das aves mantidas em granjas comerciais, tendo sido verificado que a transferência adotiva de células T CD8+, colhidas de aves convalescendo de infecção prévia com o VBI, foi eficaz em conferir proteção a aves "naive" frente ao desafio com esse mesmo vírus (CAVANAGH, 2007; COLLISON et al., 2000; PEI et al., 2001).

A resposta dos linfócitos T citotóxicos em galinhas contra a infecção pelo VBI parece exercer um papel preponderante na eliminação desse vírus do meio interno do hospedeiro durante a fase aguda da infecção. Na verdade, foi observado que a cinética da replicação viral após a infecção de aves não vacinadas previamente se correlaciona diretamente por um ou dois dias com a cinética da resposta de células T citotóxicas acompanhando, dessa forma, o aumento e depois o declínio do processo infeccioso causado pelo VBI (MONTASSIER, 2010).

Mais recentemente, com o advento de metodologias como a técnica de "microarray" e de RT-PCR quantitativo em tempo real, foram conduzidos vários estudos com amostras de tecidos do trato respiratório (traquéia e pulmões) obtidas de galinhas submetidas à infecção com modelos de agentes virais respiratórios, incluindo o VBI. Os principais resultados têm demonstrado que alguns genes têm sua expressão aumentada após o desafio de aves previamente imunizadas ou não (DEGEN et al., 2006; GUO et al., 2008; WANG et al., 2006). No entanto, esses estudos não fizeram nenhuma abordagem relacionando o aumento de expressão desses genes associados às respostas imunes com o estado de proteção ao desafio com o VBI, mensurado por exemplo por alterações patológicas traqueais, como ciliostase, lesões histológicas e replicação viral (MONTASSIER, 2010).

Portanto, é fácil compreender a importância da proposta central deste estudo, que é de mensurar em aves vacinadas com um dia de idade as respostas imunes humorais sistêmicas e locais cito-mediadas locais e em diferentes períodos pré e/ou pós-desafio, que foram realizados com três ou quatro semanas depois da imunização e correlacioná-las com o estado de proteção ao desafio, fazendo uso ou de técnicas previamente desenvolvidas e padronizadas como o S-ELISA-Con A (BRONZONI et al., 2005), ou desenvolver e otimizar novas ferramentas como a técnica de RT-PCR quantitativo em Tempo Real para a mensuração da expressão de genes associados a respostas imunes cito-mediadas inatas e adquiridas.

Em nosso estudo, é importante salientar que foram realizados ensaios iniciais para a quantificação (RNAm) de IL2 e IL4 na traquéia de aves vacinadas ou não e desafiadas experimentaltemente com a estirpe M41 do VBI. No entanto, como uma parte significativa do grupo de amostras não apresentou alterações mínimas detectáveis na expressão dos genes dessas duas citocinas, em relação às aves do grupo controle não vacinadas e não desafiadas, as análises dos perfis de expressão dessas citocinas foram eliminadas desse estudo (dados não apresentados).

7.1 Delineamento experimental I

Esse primeiro delineamento experimental foi realizado com o intuito de verificar quais intervalos pós-infecção seriam os mais adequados para avaliação das respostas imunes celulares.

A ausência de diferenças significativas nos parâmetros de proteção ao desafio com a estirpe virulenta M41 do VBI, avaliados na traquéia como replicação viral estase ciliar, histopatologia em ambos os grupos, entre os grupos de aves vacinadas e não vacinadas desse primeiro protocolo experimental indicam ou falha da vacina atenuada contra a BI ou do processo de vacinação empregado em conferir proteção contra a infecção pelo VBI, ou que foi muito curto o intervalo de três semanas entre a administração da vacina em pintinhos com um dia de idade e o desafio com a estirpe virulenta M41 do VBI. No entanto, deve-se destacar que foram observadas, na traquéia, diferenças na expressão de alguns genes associados às respostas imunes, como os

aumentos observados para as aves previamente vacinadas na expressão de Granzima homóloga A, IFNγ, IL6 e TGFβ, em determinados intervalos pós-infecção, demonstrando, que embora parcial, houve a vacinação levou à ativação de alguns fatores das respostas imunes cito-mediadas, que não foram capazes, contudo capazes de proporcionar um estado de proteção mais efetivo contra a infecção pelo VBI.

A replicação do VBI ocorre no epitélio ciliado e células mucosas em 24 h após inoculação intra-traqueal ou aerossol, e as partículas virais são confinadas a pequenos vacúolos no citoplasma. Neste experimento foi observada a detecção do VBI na traquéia de aves infectadas experimentalmente previamente vacinadas ou não, nos intervalos de 8 hpi a 7 dpi (Figura 18). Similarmente, no trabalho descrito por KOTANI et al. (2000), a detecção do antígeno viral, por imunofluorescência, foi observada em aves desafiadas experimentalmente com o VBI, nos intervalos de 16 hpi a 6 dpi.

Os resultados obtidos nesse estudo referentes à expressão gênica do CD8+ são também compatíveis com os dados descritos por KOTANI et al. (2000), que reportaram, aplicando técnicas de imuno-histoquímica, a presença de uma maior concentração de infiltrado de linfócitos T CD8+ na lâmina própria da traquéia entre 3 e 7 dias pós-infecção com o VBI em aves “naives” desafiadas experimentalmente.

Já, com relação aos aumentos inicialmente detectados, de magnitudes similares nos grupos vacinado ou não, na expressão de IFNγ (RNAm) no intervalo de 24hpi, estão provavelmente relacionados com a produção desta citocina por células NK durante a indução da resposta imune, haja visto que a produção dessa citocina é realizada principalmente por linfócitos (Th1) e células NK (WIGLEY & KAISER, 2003). Incrementos semelhantes na expressão de IFNγ, foram observados no trabalho descrito por ARIAANS et al. (2008), no qual a estimulação “in vitro” de esplenócitos de galinhas pré-imunizadas ou não com suspensão de VBI provocou, após 24h, um aumento significativo na produção de IFNγ (RNAm), fazendo com que esses autores concluíssem que o VBI atua nesse caso como estímulador policlonal, induzindo uma rápida produção de IFNγ mesmo sem exposição prévia do sistema imune dessas aves ao vírus. É possível então supor que nesse experimento, tenha ocorrido uma reposta similar com a expressão do gene codificador dessa citocina pelas amostras de traquéia

de aves apenas desafiadas. A propósito, deve-se enfatizar que essa característica de estimulação policlonal, foi peculiar ao VBI, enquanto para os outros dois vírus testados (REV e NDV) por ARIAANS et al. (2008) não foi verificado mesmo resultado.

Ainda, dentro desse mesmo contexto, DEGEN et al. (2005) também reportaram um aumento da expressão de IFNγ em amostras de baço e íleo de aves infectadas experimentalmente com o vírus da doença de Newcastle no intervalo 24 hpi, sem que houvesse um incremento na expressão dos genes codificadores de citocinas do perfil Th2, e, ademais, essa resposta revelou-se estar associada com a diminuição da expressão de IL13 e IL1β.

A produção de RNAm de Granzima A e do CD8+ apresentaram perfis de expressão cinéticos similares (correlação positiva muito forte, com r=0,8470), caracterizados por aumento significativo da expressão desses genes no intervalo de 7 dpi, principalmente nas amostras de traquéia de aves do grupo vacinado (Figuras 10 e 11). O perfil de expressão gênica do IFNγ (Figura 12) também mostrou grande similaridade com aqueles apresentados pelos genes da Granzima A e do CD8+. Constatou-se, assim, que a expressão aumentada desses três genes em aves vacinadas ou não e depois desafiadas com o VBI, está estreitamente relacionada, uma vez que a maioria dos CTLs é CD8+, embora uma limitada atividade citolítica tenha sido demonstrada por linfócitos T CD4+, devendo-se lembrar que as perforinas juntamente com as granzimas, proteases séricas estão presentes em grânulos secretórios de linfócitos T citolíticos (COLLISON et al., 2000; GARCIA-SANZ et al., 1990).

Dessa forma, pode-se relacionar os incrementos na expressão de genes associados às células T citotóxicas (CD8+, Granzima A e IFNγ observados em nosso estudo com uma maior atividade efetora dessas células, pois esses dados são consistentes com resultados observados em investigações anteriormente feitas, que evidenciaram o papel desempenhado por CTLs no “clearence” inicial do VBI em aves não imunes e infectadas por este vírus (COLLISON et al., 2000; SEO & COLLISON, 1997). E, além disso, confere um maior suporte a esta hipótese o fato de que as CTLs são uma das maiores fontes de IFNγ e são também caracterizadas pela presença do marcador CD8+ e por sua capacidade de eliminar seletivamente células infectadas por

vírus, através de seus componentes granulares como perforinas e granzimas. No entanto, não se pode deixar de considerar que marcadores de CTLs tais como Granzima A e Fas foram ativados após a infecção primária de aves com estirpe Massachussets do VBI e esse aumento da expressão de Granzima para lise das células alvo infectadas por vírus, pode ser proporcionado tanto pelas CTLs como pelas células NK (GUO et al., 2008). Adicionalmente, WANG et al. (2006) também descreveram aumento da expressão de Granzima homóloga (RNAm) na traquéia de aves desafiadas com o VBI aos 3dpi.

Ainda, dentro do contexto acima explanado, GUO et al. (2008) observaram que uma imunidade inata potente e uma resposta imune local adaptativa do tipo Th1 foram induzidas pela imunização primária com a vacina atenuada contendo a estirpe Massachusetts do VBI. Esses autores aventam a hipótese de que esses tipos celulares são os responsáveis pelo "clearence" viral dos pontos de infecção local, e, em adição a ação dessas células ocorre uma forte resposta humoral dominada por IgG nas mucosas, já que nesse mesmo estudo foi encontrado uma expressão bastante aumentada do gene codificador da cadeia pesada gama de imunoglobulinas na traquéia de aves previamente vacinadas e depois desafiadas com o VBI.

Em relação aos resultados referentes à expressão de citocinas pró-inflamatórias, ou de citocinas anti-inflamatórias encontrados nesse estudo, verifica-se que o incremento na expressão do gene de IL1β (RNAm) apresentou correlação positiva substancial com a expressão das demais citocinas pró-inflamatórias (IL6 e TNF) e também com a expressão das citocinas anti-inflamatórias (IL10 e TGF). No entanto, quando se consideram as alterações patológicas na traquéia de aves desafiadas, com o VBI, constata-se que a expressão aumentada de IL1β apresentou correlação positiva moderada somente com a replicação viral, sugerindo de alguma forma, estar atuando mais no sentido de facilitar a multiplicação desse agente infeccioso nesses tecidos do trato respiratório, do que contribuindo para a restrição do processo infeccioso causado por este vírus.

Para se compreender melhor o papel biológico dessa citocina na imunidade anti-viral, deve-se levar em conta que, em mamíferos, a IL1β é produzida por uma grande

diversidade de células do organismo hospedeiro, como conseqüência da estimulação por microrganismos, ou de seus produtos, e está vinculada a morte celular programada ou apoptose de células do hospedeiro. Além disso, esta citocina se caracteriza por sua elevada atividade pró-inflamatória, que resultam em uma maior ativação do sistema imune na resposta de fase aguda, pois a IL1β ativa uma variedade de células incluindo macrófagos e linfócitos T, que podem induzir a produção de outras citocinas ou quimiocinas com atividades contra os agentes infecciosos (WIGLEY & KAISER, 2003).

No tocante à expressão de IL6, foram encontrados aumentos relevantes que apresentaram correlações positivas com a expressão dos genes de IL1β, IL10 e TGF, e com todos os parâmetros referentes às lesões traqueais (Ciliostase, Histopatologia e Replicação viral). Por tudo isso, constata-se que esta citocina apresentou-se como um bom indicador da resposta inflamatória induzida pelo VBI e que parece estar mais envolvida na gênese das alterações patológicas traqueais do que proteção contra o processo infeccioso pelo VBI. A propósito, ASIF et al (2007) também descreveram a ocorrência de um aumento pronunciado da expressão de IL6, embora não em traquéia, mas em rins de aves infectadas experimentalmente com uma estirpe do VBI nefropatogênica, tendo havido um pico de expressão aos 4 dias pós-infecção, o qual foi acompanhado de aumento de proteínas de fase aguda produzidas pelo fígado e de IL6 sistêmico (no soro) e da ocorrência de lesões mais severas nos rins dessas aves.

Ainda para se entender melhor o papel da IL6, na infecção contra agentes infecciosos virais, DEGEN et al. (2006) encontraram um aumento mais pronunciado na expressão de IL6, em pulmões de aves desafiadas com vírus de Influenza aviária, e que haviam sido previamente imunizadas ou não, no período de 1 dpi, entretanto esse aumento não foi observado em aves previamente imunizadas com uso de um adjuvante / imunopotenciador. Portanto, deve-se entender em princípio que a IL6 é uma citocina tipicamente pró-inflamatória que atua tanto na imunidade inata quanto na adaptativa (ABBAS & LICHTMANN, 2005) e que essa citocina é produzida em resposta à presença de agentes infecciosos. E, ademais, deve-se compreender que essa citocina juntamente com IL1 e TNF, atuam estimulando a síntese de proteínas de fase aguda

por hepatócitos, na produção de neutrófilos pela medula óssea e na maturação de linfócitos B em plasmócitos (WIGLEY & KAISER, 2003).

Em relação à quantificação da expressão do gene de TNF, foi observado em nosso estudo um aumento mais acentuado somente no intervalo de 24 hpi para ambos os grupos de aves; vacinado e não vacinado, contra o VBI e, apesar de os maiores valores terem sido observados no grupo vacinado em relação ao não vacinado, a diferença não foi significativa. Um aspecto interessante nesse caso é que essa elevação de TNF apresentou uma correlação moderada negativa com os escores das alterações patológicas traqueais, como ciliostase e histopatologia.

No tocante às principais características e funções biológicas do TNF, sabe-se que é o principal mediador da resposta inflamatória aguda contra bactérias Gram-negativas e outros microrganismos infecciosos, sendo o responsável por muitas das complicações sistêmicas de infecções graves que podem ocorrer nesses casos (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Ademais, diversas pesquisas sobre membros da superfamília do fator de necrose tumoral (TNFSF) e seus receptores têm demonstrado uma grande diversidade de funções biológicas, incluindo homeostase das células imunes, desenvolvimento e organogênese. As proteínas do TNFSF e receptores são abundantemente expressos no sistema imune, e são criticamente envolvidos na diferenciação, proliferação e apoptose das células imunes. Foi descrita uma atividade aumentada de TNF produzido por macrófagos derivados do sangue periférico de galinhas, que haviam sido submetidas à infecção experimental com *Eimeria spp*. (PARK et al, 2007).

Na verdade, já é reconhecido que a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL1β e IL6, é uma das reações iniciais da resposta imune inata do hospedeiro contra diversos tipos de agentes infecciosos. A ação combinada dessas citocinas ocasiona febre, leucocitose e produção de proteínas de fase aguda. No presente experimento, foi observado aumento dessas três citocinas a partir de 24 hpi, com pico de produção para TNF nesse intervalo, e aos 3 dpi para IL1β e IL6. Esse perfil de expressão pode ser justificado pelo papel principal do TNF, que é estimular a produção de IL1β e IL6. Pelo teste de Spearman, foi observada correlação positiva

substancial entre IL1β e IL6 ou TNF, reforçando a atividade sinérgica entre essas citocinas.

Além disso, foi relatado que perfis de citocinas em soro de pacientes acometidos pela SARS ("Síndrome Respiratória Aguda Severa") demonstraram que os níveis de IL6 e IFNγ estão significativamente aumentados e estão estreitamente relacionados com a severidade da SARS (OKABAYASHI et al., 2006).

A expressão gênica de IL10 foi encontrada aumentada em algumas amostras de traquéia de aves dos grupos vacinado e não vacinado, no intervalo de 3 dpi. Estudos preliminares em galinhas demonstraram que a produção de IL10 pode estar acompanhada de diminuição da produção de IFNγ, mas também por aumento da produção simultânea de IL10 e IFNγ, como foi o caso desse experimento. Ademais, deve ser notado que a IL10 possui efeitos imunoestimulatórios em certas espécies, como indução da expressão de MHC II e estimulação de linfócitos T citotóxicos (ARIAANS et al., 2008). Ademais a IL10 é uma citocina associada ao perfil Th2 e se caracteriza por sua ação inibidora das respostas inflamatórias "in vivo" e das citocinas com perfil Th1, apresentando, ainda, função imune-reguladora na resposta inflamatória exacerbada, uma vez que inibe os macrófagos e a ativação de células T, induzindo o sistema imune a um estado de repouso (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

7.2 Delineamento experimental II

Tendo em vista, que no Delineamento Experimental I, a vacinação de pintinhos com um dia de idade não conferiu proteção contra a infecção experimental pelo VBI, no segundo Delineamento Experimental, as aves foram desafiadas aos 28 dias de idade, e não aos 21 dias conforme o protocolo adotado anteriormente. Ademais, por se tratar de um experimento, no qual um dos objetivos foi o de verificar se o efeito protetor conferido pela vacinação seria dose dependente, a via de vacinação foi a óculo-nasal e não aerossol, para que se tivesse um maior controle e uniformidade do procedimento de vacinação.

A alteração nesses parâmetros do protocolo experimental I revelou que as aves desenvolveram, nesse segundo delineamento experimental uma maior estado de

proteção vacinal contra a infecção pelo VBI, já que as lesões observadas através da avaliação do movimento ciliar da traquéia nos grupos vacinados (com diferentes doses) e submetidos ao desafio diferiram significativamente do grupo CP, e não ultrapassaram o escore de 1,75 (Tabela 4 e Figura 49). E, similarmente, pela avaliação histopatológica na traquéia, os escores não ultrapassaram 4, 13 e 18, para os grupos imunizados com dose cheia (DC), ½ dose (1/2D) e ¼ dose (1/4D), respectivamente (Figura 50). Além disso, embora, o VBI tenha sido detectado pela técnica de RT-PCR em tempo real nas amostras de traquéia das aves de todos os grupos experimentais aos 5 dpi, os valores de número de cópias do VBI obtidos nas amostras traqueais das aves do grupo CP foram significativamente superiores em relação aos valores dos grupos vacinados (Figura 48).

No entanto, no trabalho descrito por ANDRADE et al. (1982), amostras traqueais provenientes de galinhas desafiadas com o VBI, previamente imunizadas contra esse vírus, não apresentaram positividade quanto avaliadas pelo teste de isolamento viral em ovos embrionados. A justificativa para discrepância desses resultados, com os obtidos durante o atual experimento, se resume à elevada sensibilidade analítica das técnicas de biologia molecular quando comparadas às demais metodologias convencionais.

Ainda, os resultados obtidos pela avaliação histopatológica da traquéia revelaram que o efeito protetor conferido pela vacinação é dose-dependente, sendo que as lesões pós-desafio (5dpi) verificadas no grupo que recebeu DC, foram significativamente inferiores ao que recebeu ¼ D, e, embora não tenha sido constatada diferença significativa entre o grupo que recebeu DC e o que recebeu ½ D, somente o primeiro apresentou diferença significativa em relação ao grupo CP (Figura 50). Comportamento semelhante às observações das lesões histológicas traqueais, tiveram os achados de ciliostase, pois somente os grupos que receberam DC ou ½D diferiram significativamente do grupo CP (Figura 49).

Um dado que confere mais consistência aos nossos resultados de avaliação das alterações patológicas traqueais (Replicação viral, Histopatologia e Ciliostase) é que todos os três parâmetros avaliados apresentaram correlações positivas significativas entre si, quando comparados dois a dois. Nesse mesmo contexto, é interessante

destacar que ANDRADE et al. (1982) e WINTERFIELD & FADLY (1972), observaram correlações positivas significativas entre as técnicas de Isolamento viral, Histopatologia e Ciliostase em aves desafiadas com o VBI.

Quanto à produção de anticorpos anti-VBI verifica-se que ela variou em função da dose vacinal admnistrada no primeiro dia de idade. Dessa forma, somente o grupo que recebeu dose cheia apresentou níveis significativamente maiores de anticorpos anti-VBI do que os do grupo controle de aves não vacinadas, tanto a nível sistêmico (soro sanguíneo) como local (secreção lacrimal), para todos os isótipos avaliados, com exceção de IgM na lágrima e de IgA sistêmico, que não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais em nenhum dos intervalos avaliados.

Os anticorpos anti-VBI do isótipo IgG na lágrima revelou-se o melhor marcador para se avaliar a proteção contra o VBI, em relação à imunidade humoral. Tendo em vista que os resultados da quantificação desse isótipo foi o único que apresentou correlação negativa substancial com os três parâmetros de alterações patológicas traqueais induzidas pelo VBI, que foram avaliados (ciliostase, histopatologia e replicação viral). Assim, à medida em que maiores níveis desse anticorpo foram detectados na lágrima, menores foram as lesões traqueais (ciliostase e histopatologia) e menor foi a carga viral na traquéia (Quadro 8).

Para reforçar esses nossos resultados acima descritos, destacando a importância de anticorpos anti-VBI do isótipo IgG presentes na mucosa, vem o achado de GUO et al. (2008) na técnica de “microarray”, que ao analisar amostras traqueais obtidas de aves vacinadas e depois revacinadas com estirpe atenuada do VBI (sorotipo Massachusetts), observaram que um dos genes que está mais expresso é o que codifica a cadeia pesada gama de imunoglobulina G, levando esses autores a inferirem que este isótipo de imunoglobulinas é um marcador da memória imunológica e deve exercer um papel fundamental na proteção da mucosa traqueal contra a re-exposição ao mesmo vírus. Deve-se salientar, no entanto, que em nosso estudo, ao invés de aumento da expressão do gene IgH-gama (IgG), foram detectados aumentos significativos nos dois intervalos pós-desafio (24 hpi e 5 dpi) dos níveis de anticorpos anti-VBI do isótipo IgG na secreção lacrimal e as aves dos grupos experimentais

receberam vacina atenuada (sorotipo Massachusetts) com um dia de idade, e não com três semanas de idade e depois de quatro semanas, essas aves foram desafiadas com estirpe virulenta do VBI (M41) e não com estirpe atenuada vacinal tal como foi feito por GUO et al. (2008).

Nesse segundo Delineamento experimental, também pôde ser observado o papel fundamental da memória imunológica celular conferida pela vacinação no primeiro dia de idade, cujos efeitos também foram dose-dependentes na vacinação, o qual está abaixo melhor explanado.

No intervalo de 24hpi, o aumento exacerbado da expressão gênica de CD8+, da Granzima homóloga A e do IFNγ (Figuras 41 e 42), principalmente nas aves que receberam DC da vacina, deve-se à memória imunológica conferida pela vacinação no primeiro dia de idade. No caso da Granzima A e do IFNγ, as principais fontes produtoras são os linfócitos T (Th1 e/ou CTLs), sendo que o gene codificador do marcador de CTL (CD8+) também revelou um incremento significativo (Figura 40). É interessante neste ponto destacar que as células Th1 são as responsáveis pela ativação ou pelas atividades efetoras de importantes respostas imunes antivirais, através, ou do aumento da expressão de moléculas de MHC de classe I em células apresentadoras de antígenos para interação com CTLs (CD8+), da sinalização para os linfócitos B trocarem os isótipos de anticorpos a serem produzidos (“class switching”); por exemplo para anticorpos opsonizantes e fixadores de complemento (IgG), ou ainda da estimulação de macrófagos e da atividade citolítica das células NK (HACKNEY et al., 2003).

Embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre os grupos vacinados com as diferentes doses quanto à expressão de genes relacionados à atividade dos linfócitos T citotóxicos (CD8+, Granzima homóloga A e IFNγ), nesse intervalo (de 24 hpi), cuja característica essencial é a de conferir resultados que evidenciem a presença de memória imunológica celular, foram constatadas diferenças significativas em relação ao grupo CP, quanto à expressão de IFNγ e CD8+, somente contra o grupo que recebeu DC.

Dentre os marcadores avaliados com o intuito de verificar se houve indução de memória da imunidade celular, os incrementos da expressão do gene da Granzima homóloga A (RNAm) com 24 hpi, foi a única que apresentou correlação negativa substancial com os três parâmetros referentes à mensuração da severidade de lesões traqueais (ciliostase, histopatologia e replicação viral) aos 5 dpi (Quadro 8). Por outro lado, os aumentos da expressão dos genes codificadores de CD8+ e IFNγ (RNAm) apresentaram correlações negativas substanciais somente com os escores de histopatologia traqueal. Similarmente a esses nossos achados, DEGEN et al. (2006) observaram, em amostras de pulmão em aves desafiadas com estirpe H9N2 do vírus da Influenza aviária, previamente imunizadas, um aumento da expressão de CD8+, no intervalo de 24hpi.

Ainda, um outro aspecto interessante para se entender melhor as possíveis implicações que a maior expressão do gene de Granzima A poderia ter nos mecanismos de proteção contra a infecção pelo VBI, é o fato de que estudos recentes têm revelado que as Granzimas (A e B), além de mediarem atividades citotóxicas em conjunto com as perforinas, são também capazes de exercer outras atividades biológicas importantes, tais como estimular a secreção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo aí o IFNγ e inativar patógenos intracelulares como vírus, por meio da clivagem de proteínas virais, bem como podem atuar no sentido de remodelar as matrizes extra-celulares, contribuindo para o processo de reparação tecidual (FROELICH et al., 2009; VAN DOMMELEN et al. 2006).

No entanto, diversamente desses nossos achados com a resposta imune celular, GUO et al. (2008) não observaram alterações na expressão de moléculas associadas à respostas mediada por linfócitos T citotóxicos em amostras de traqueía colhidas de aves vacinadas com estirpe atenuada do VBI e submetidas à re-exposição com o mesmo vírus vacinal. Essa diferença pode estar relacionada, como já explicado anteriormente, ao protocolo experimental adotado por esses autores, que usaram uma mesma estirpe atenuada do VBI para a infecção primária e para a secundária, a diferença na idade das aves na infecção primária e secundária, e no intervalo entre os estímulos com esse vírus e ao método utilizado para quantificação da expressão

gênica, pois no estudo de GUO et al. (2008) foi adotada a técnica de análise por "microarray", enquanto que no nosso estudo foi usada a técnica de RT-PCR em tempo real. A técnica de "microarray", embora permita a análise simultânea da expressão de centenas e/ou milhares de genes, apresenta algumas restrições para ser usada nas avaliações mais acuradas da expressão gênica.

Quanto à IL1β, embora a produção dessa citocina, seja uma característica da resposta pró-inflamatória durante a imunidade inata, nesse experimento, essa citocina apresentou-se aumentada nos grupos vacinados no intervalo de 24hpi, revelando correlações positivas significativas com o grupo de marcadores da resposta Th1 ou por T citotóxico (IFNγ, CD8+ e Granzima homóloga A) da imunidade adaptativa. Como não existem relatos na literatura de que os linfócitos Th1 ou T citotóxicos CD8+ estejam envolvidos na produção de IL1β, supõe-se que a produção dessa citocina tenha sido estimulada indiretamente, pela via: Linfócito Th1 / CTL CD8+ → produção de IFNγ → estimulação de macrófagos → produção de IL1β. Alternativamente, a Granzima A, no lugar do IFNγ poderia atuar como sinalizador e estimulador de uma maior produção de IL1β (FROELICH et al., 2009, VAN DOMMELEN et al. 2006).

Ademais, no intervalo de 24hpi, foram encontrados incrementos significativos na expressão de IL10 (RNAm) pelas aves que receberam dose cheia da vacina contra o VBI e estes aumentos apresentaram correlação negativa moderada com os escores de estase ciliar (Quadro 8 e Figura 45). Deve-se destacar que essa citocina desempenha atividades em ambos tipos de imunidade; inata e adaptativa, sendo que na imunidade adaptativa é produzida por macrófagos ativados e na imunidade adaptativa por células Th2, sendo que sua função principal é a de inibir a produção de IFNγ por células Th1 e também reduzir as atividades pró-inflamatórias das citocinas IL1β, IL6 e TNF (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

E, mais recentemente, foi verificado que a infecção por Influenza, em camundongos, induziu rápido e transitório aumento da produção de IL10 no trato respiratório, que desempenhou papel fundamental na regulação do desenvolvimento de inflamação nos pulmões, foi constatato também que esta citocina é produzida por

linfócitos T CD8+ e T CD4+ efetores, e que a maior fonte, neste experimento foram os linfócitos T CD8+ (SUN et al., 2009).

Em relação ao papel desempenhado pelas citocinas pró-inflamatórias (IL1β, IL6 e TNF) na patogênese da infecção pelo VBI, embora todas tenham apresentado, no intervalo de 5dpi, maiores níveis de expressão no grupo CP, verifica-se que somente os aumentos da expressão do gene de IL1β (RNAm) diferiram significativamente dos grupos vacinados (DC e 1/2D). Provavelmente, se uma amostragem superior fosse utilizada (nesse experimento o n / grupo foi igual a sete), diferenças significativas em relação à expressão das demais citocinas poderiam ter sido observadas, já que a variação individual foi muito ampla, e o aumento da amostragem pode diminuir o efeito dessa variação.

Ao contrário do que fora observado com as aves dos grupos vacinados, especialmente aquelas que receberam dose cheia, a expressão de genes relacionadas à atividade de CTLs (CD8+, Granzima A e IFNγ) inverteu-se no segundo intervalo pi (5 dpi), tendo-se apresentado mais elevada no grupo CP e mais reduzida nos grupos de aves vacinadas, principalmente aquele que recebeu DC da vacina. Na verdade, foram observadas diferenças significativas entre esses dois grupos experimentais (CPI e DC) para todos os marcadores das respostas mediadas pelos CTLs (CD8+, Granzima homóloga A e IFNγ).

Um achado interessante nesse mesmo intervalo pi (5 dpi) foi a expressão mais elevada do gene de TGF no grupo CP em relação aos grupos vacinados com dose cheia ou 1/2D, mas não diferiu do grupo que recebeu 1/4D. Esta citocina compõe juntamente com a IL10 o grupo de citocinas anti-inflamatórias, mas a expressão de IL10 nesse intervalo, não apresentou diferenças significativas entre os grupos experimentais investigados nesse estudo. Provavelmente o aumento do TGF atue como sinalizador no sentido de reduzir as respostas imunes inatas e adaptativas primárias (aves previamente não imunizadas), sobretudo no sentido de inibir a produção de citocinas com forte atividade pró-inflamatória e que na tentativa de proteger o hospedeiro e promover a eliminação do patógeno viral envolvido nesse processo, causam danos relevantes ao organismo hospedeiro. Nesse contexto, foi relatado que houve um

aumento na expressão do RNAm de TGF nas tonsilas cecais, no baço e no duodeno de aves infectadas experimentalmente com Eimeria acervulina, provavelmente como parte de uma resposta anti-inflamatória. (CHOI et al., 1999)

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sucesso no controle de infecções virais requer que o sistema imune do hospedeiro (inato e adaptativo) eliminem o agente infeccioso sem causar, ou causando um mínimo de lesões imunopatológicas ao organismo hospedeiro. Ademais deve-se levar em conta que as alterações patológicas induzidas durante uma infecção viral não são somente produzidas de forma direta pelos agentes virais. Ao contrário, em muitas circunstâncias, as respostas imunes anti-virais são responsáveis pelo quadro patológico que acompanha o processo infeccioso e não raro acarreta os danos mais sérios e até a morte do hospedeiro. Assim, a busca por meios imunoprofiláticos mais eficazes deve passar antes pelo melhor conhecimento dos mecanismos gerados pelas respostas imunes após a introdução do agente infeccioso em aves previamente imunizadas ou não e que atuam mais diretamente na proteção, bem como dos outros mecanismos gerados no curso dessas respostas imunes que atuam mais na patogenia dessa doença infecciosa a fim de no final, procurar desenvolver ou otimizar preparações vacinais e esquemas imunoprofiláticos mais efetivos contra o patógeno viral.

Nesse sentido, constata-se que o presente estudo trouxe contribuições relevantes para se entender quais são os mecanismos da respostas imunes humorais e das cito-mediadas que atuam junto à porta de entrada do VBI (mucosa traqueal) para impedir a instalação do processo infeccioso, com um mínimo de efeitos patológicos ou imunopatológicos, nas aves previamente imunizadas em fase mais precoce de vida (pintinhos de um dia de idade). Os resultados obtidos permitiram definir alguns marcadores mais relevantes para a resposta imune humoral e alguns outros para a resposta imune cito-mediada, os quais poderão ser usados no monitoramento das respostas imunes gerados pelas vacinas convencionais ou por novas preparações vacinais.

A produção de citocinas é uma das principais respostas dos linfócitos T ao reconhecimento antigênico (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Portanto, a quantificação de citocinas através da técnica aqui desenvolvida representa um grande potencial para avaliação da imunidade celular mucosa traqueal, que se constitui a porta de entrada do VBI em aves.

Embora, os resultados observados a partir da avaliação do movimento ciliar da traquéia, histopatologia e replicação viral não apresentaram diferenças significativas entre o grupo CP e o vacinado, concluiu-se que a vacinação via aerossol contra o VBI realizada no primeiro dia de idade (Delineamento experimental I) conferiu proteção imunológica parcial, já que ao analisar os resultados referentes à quantificação da expressão de genes associados a respostas imunes na traquéia das aves do grupo previamente vacinado, foram observadas para alguns desses genes diferenças estatisticamente significativas em relação às aves do grupo não imunizado e somente desafiado. Portanto, apesar de não conferir um estado de proteção “completo” contra o desenvolvimento da doença e o aparecimento de lesões, a vacinação conferiu às aves de um dia de idade memória imunológica.

Para esse primeiro protocolo experimental tanto os anticorpos presentes no soro sanguíneo como na secreção lacrimal, independente do isótipo a que pertençam (IgG, IgM, ou IgA) não demonstraram estar associados com o estado de imunidade parcial e apenas os pequenos incrementos ocorridos são indicativos de indução de memória imunológica, sendo que seus incrementos foram mais pronunciados após o desafio.

Doença e inflamação são processos complexos e a resposta não é dependente de um simples mediador inflamatório mas geralmente de uma sobreposição de vias inflamatórias e de interações entre citocinas (ASIF et al., 2007), nesse contexto, o Delineamento experimental II proporcionou melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na imuno-patogênese do VBI, bem como a seleção de marcadores de memória imunológica celular (Granzima homóloga A), de resposta imune humoral (IgG na lágrima) e de inflamação (IL1β).

Os resultados aqui apresentados corroboraram em parte com os achados obtidos por KOTANI et al. (2000) e por GUO et al. (2008). Os primeiros autores

demonstraram por meio de técnicas de imuno-histoquímica, a relevância do influxo de linfócitos TCD8+ na eliminação do VBI dos tecidos traqueais em uma fase precoce pós-infecção. No segundo caso, foi descrita a ocorrência de uma potente imunidade inata e local adaptativa com perfil cominante Th1 após a imunização primária com VBI do grupo Massachussets, que parece ser a responsável pelo “clearance” viral e, ademais que uma forte resposta humoral dominada por IgG, foi ativada após uma imunização secundária, a qual parece fornecer proteção contra a infecção por esse vírus, através da neutralização de partículas virais.

9 CONCLUSÕES

- A vacinação contra o VBI no primeiro dia de idade, não protegeu as aves contra o desafio por esse vírus aos 21 dias de idade, enquanto foi observada proteção ao desafio feito aos 28 dias de idade.
- Os níveis dos anticorpos anti-VBI do isótipo IgG na lágrima foram considerados o marcador de eleição, dentre os demais parâmetros avaliados da imunidade humoral, para correlação com o estado de proteção contra a infecção pelo VBI.
- A vacinação com estirpe H120 do VBI, quando administrada localmente, no primeiro dia de idade, induz a produção de células T de memória, que atuam na proteção contra a infecção por esse mesmo vírus.
- A memória imunológica conferida pela vacinação contra a BI, tanto humoral como celular, é dependente da dose vacinal utilizada. Sendo que a administração de dose cheia (recomendada pelo fabricante, nesse experimento com título de $10^{4,3}$DIE/dose) no primeiro dia de idade das aves, conferiu melhor estado de proteção contra a infecção pelo VBI, se comparada às demais subdosagens utilizadas.
- A IL1β, embora seja uma citocina prioritariamente pró-inflamatória da imunidade inata, apresentou atividade na imunidade adaptativa, particularmente na resposta de memória, diferentemente da IL6 e do TNF.
- A mensuração da expressão gênica da Granzima homóloga A no intervalo de 24hpi, foi considerada o melhor marcador de resposta de memória imunológica celular, já que sua expressão apresentou correlação significativa com os três métodos avaliados que indicam lesão ocasionada pela atividade do VBI.

10 REFERÊNCIAS

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

ANDRADE, L. F.; VILLEGAS, A. P.; FLETCHER, O. J.; LAUDENCIA, R. Evaluation of ciliary movement in tracheal rings to assess immunity against infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, v.26(4), p.805-14, 1982.

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

ARIAANS, M .P.; MATHHIJS, M. G. R.; VAN HAARLEM, D.; VAN DE HAAR, P.; VAN ECK, J.H. H.; HENSEN, E. J.; VERVELDE, L. The role of phagocytic cells in enhanced susceptibility of broilers to colibacillosis after infectious bronchitis virus infectious. **Vet. Immunol. Immunopat.**, v. 123(3-4), p.240-250, 2008.

ASIF, M.; LOWENTHAL, J. W.; FORD, M. E.; SCHAT, K. A.; KIMPTON, W. G.; BEAN, A. G. D. Interleukin-6 expression after infectious bronchitis virus infection in chickens. **Viral Immunol.**, v.20 (3), p.479-486, 2007.

BOURSNELL, M. E.; BROWN, T.D.; FOULDS, I.J.; GREEN, P.F.; TOMLEY, F.M.; BINNS, M.M. Completion of the sequences of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus**. J. Gen. Virol.**, v.68(1), p.57-77, 1987.

BRONZONI, R. V. M.; MONTASSIER, M. F. S.; PEREIRA, G.T.; GAMA, N.M.; SAKAI, V.; MONTASSIER, H.J. Detection of infectious bronchitis virus and specific anti-viral antibodies using a concanavalin A-sandwich-ELISA. **Viral Immunol.**, v.18, n.3, p.569-578, 2005.

CALLISON, S. A. ; HILT, D.A. ; BOYNTON, T.O. ; SAMPLE, B.F.; ROBISON, R. ; SWAYNE, D.E. ; JACKWOOD, M.W. Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. **J. Virol. Methods**, v.138, p.60-65, 2006.

CAPUA, I.; MINTA, Z.; KARPINSKA, E.; MAWDITT,K.; BRITTON, P.; CAVANAGH, D.; GOUGH, R. E. Co-circulation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts). **Avian Pathol.**, v.28, n.5, p.587-92, 1999.

CARON, L. F. O sistema imune das aves e a resposta às vacinações. In: Curso de sanidade avícola, Jaguariúna, SP. **Anais**... Jaguariúna: 2008.

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Vet. Res.**, v.38, p.281-297, 2007.

CAVANAGH, D. The coronavirus surface glycoprotein. In: SIDELL, S. G. **The coronoviridae**. New York: Plenum Press, 1995, p.73-113.

CAVANAGH, D. Strutural polypeptides of coronavirus IBV. J. Gen. Virol., Reading, v.53, n.1, p.93-103, 1981.

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

CHAMIZO, C.; RUBIO, J.M.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative análisis of multiple cytokines in canine peripheral blood mononuclear cells by a single tube RT-PCR. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.83, p.191-202, 2001.

CHOI, K.D.; LILLEHOJ, H.S.; ZALENGA, D.S. Changes in local IFN-gamma and TGF-beta4 mRNA expression and intraepithelial lymphocytes following Eimeria acervulina infection. **Vet. Immunol. Immunopathol.,** v. 71, p. 263-275, 1999.

COLLISSON, E.W.; PEI, J.; DZIELAWA, J.; SEO, S.H. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry. **Dev. Comp. Immunol.**, v.24, p. 187-200, 2000.

DARBYSHIRE, J. H.; PETERS, R. W. Humoral antibody response and Assessment of protection following primary vaccination of chickens with maternally derived antibody against avian infection bronchitis virus**. Res. Vet. Science**, v.38, p.14-21, 1985.

DEGEN, W. G. J.; SMITH, J.; SIMMELINK, B.; GLASS, E.J.; BURT, D.W.; SCHIJNS, V.E. Molecular immunophenotyping of lungs and spleens in naive and vaccinated chickens early after pulmonary avian influenza A (H9N2) virus infection. **Vaccine**, v.24, p.6096-6109, 2006.

DEGEN, W. G. J.; DAAL, N.; ROTHWELL, L.; KAISER, P.; SCHIJNS, V.E. Th1/Th2 polarization by viral and helminth infection in birds. **Vet. Microbiol.**, v.105, p.163-167, 2005.

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.**, v.25, n.3, p.481-501, 1996.

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

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

ELDAGHAYES, I.; ROTHWELL, L.; WILLIAMS, A.; WITHERS, D.; BALU, S.; DAVISON, F.; KAISER, P. Infectious bursal disease virus: strains that differ in virulence differentially modulate the innate immune response to infection in the chicken bursa. **Viral Immunol.**, v.19, n.1, p.83-91, 2006.

FAVRE, N.; BORDMANN, G.; RUDIN, W. Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT and semi-quantitative RT-PCR. **J. Immunol. Methods**, v.204, p.57-66, 1997.

FROELICH, C.J., PARDO, J., SIMON, M.M. Granule-associated serine proteases: Granzymes might not just be killer proteases. **Trends Immunol.** v.30, p.117-123, 2009.

GARCIA-SANZ, J. A.; MACDONALD, H.R. ; JENNE, D.E. ; TSCHOPP, J. ; NABHOLZ, M. Cell specificity of granzyme gene expression. **The J. Immunol.**, v.145, n.9, p.3111-3118, 1990.

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.

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

GÖBEL, T.W.; KASPERS, B.; STANGASSINGER, M. NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken. **Int Immunol.**, v.13, n.6, p.757-62, 2001.

GUO, X.; ROSA, A.J.; CHEN, D.G.; WANG, X. Molecular mechanisms of primary and secondary mucosal immunity using avian infectious bronchitis virus as a model system. Vet**. Immunol. Immunopat.**, v.121, p.332-343, 2008.

HACKNEY, K.; CAVANAGH, D.; KAISER, P.; BRITTON, P. In vitro and in ovo expression of chicken gamma interferon by a defective RNA of avian coronavirus infectious bronchitis virus. **J. Virol.**, v.77, n.10, p.5694-5702, 2003.

HEIDARI, M.; ZHANG, H.M.; SHARIF, S. Marek's disease virus induces Th-2 activity during cytolytic infection. **Viral Immunol.**, v.21, n.2, p.203-14, 2008.

HIPÓLITO, O.; BOTTINO, J. A.; PINTO, A. A. Estudos de duas amostras de vírus isoladas de casos da "síndrome nefrite-nefrose" das galinhas no Brasil. **Ciênc. Cult.**, v.25, p.569, 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.

IGNJATOVIC, J.; GALLI, L. The glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chichens. **Arch. Virol**., v.138, n.1, p.117-134, 1994.

ITO, N. M. K. et al. Controle de variantes do vírus da bronquite infecciosa das galinhas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2006, Santos, SP. **Anais** ... Campinas : FACTA, 2006, p.75-99.

JANSE, E.M.; VAN ROOZELAAR, D.; KOCH, G. Leukocyte subpopulations in kidney and trachea of chickens infected with infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, v.23, n.3, p.513-23, 1994.

JIA, W.; KARACA, K.; PARRISH, C.R.; NAQI, S.A. A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. **Arch. Virol**., v.140, n.2, p.259-271, 1995.

JONES, R. C. Viral respiratory diseases (ILT, aMPV infections, IB): are they ever under control?. **British Poul Sc.**, v.51, n.1, p.1 – 11, 2010.

KANT, A.; KOCH, G.; VAN ROOZELAAR, D.J.; KUSTERS, J.G.; POELWIJK, F.A.; VAN DER ZEIJST, B.A. Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolypeptide. **J. Gen. Virol.**, v.73, n.3, p.591-596, 1992.

KOTANI, T.; WADA, S.; TSUKAMOTO, Y.; KUWAMURA, M.; YAMATE, J.; SAKUMA, S. Kinetics of lymphocytic subsets in chicken tracheal lesions infected with infectious bronchitis virus. **J. Vet. Med. Sci..**, v.62, n.4, p.397-401, 2000.

KUSTERS, J. G.; JAGER, E.J.; NIESTERS, H.G.; VAN DER ZEIJST, B.A. Sequence evidence for RNA recombination in fields isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus. **Vaccine**, v.8, n.6, p.605-608, 1990.

LAI, M. M. C.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Adv. Virus Res.**, v.48, n.1, p.1-77, 1997.

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

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

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, n.1-2, p.31-40, 2001.

MONTASSIER, H.J. Bronquite infecciosa das galinhas. In: BERCHIERI JR. A.; MACARI, M. **Doença das aves**. 1 Ed. Campinas: FACTA, 2000. p.293-300.

MUELLER, S.N.; LANGLEY, W.A.; LI, G.; GARCÍA-SASTRE, A.; WEBBY, R.J.; AHMED, R. Qualitatively different memory CD8+ T cells are generated after lymphocytic choriomeningitis virus and influenza virus infections. **J Immunol.** v.185, n.4, p.2182-90, 2010.

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

OIE. Avian infectious bronchitis. In: **OIE Terrestrial Manual 2008**. P. 443-455.

OKABAYASHI, T.; KARIWA, H.; YOKOTA, S.; IKI, S.; INDOH, T.; YOKOSAWA, N.; TAKASHIMA, I.; TSUTSUMI, H.; FUJII, N. Cytokine regulation in SARS coronavirus infection compared to other respiratory virus infections. **J. Med. Virol.**, v.78, p.417–424, 2006.

OKINO, C. H. **Desenvolvimento da técnica de RT-PCR em tempo real para a detecção e diferenciação de estirpes do vírus da bronquite infecciosa das galinhas**. Jaboticabal, 2007, 104p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – UNESP, Jaboticabal, 2007.

OWEN, R. L.; COWEN, B. S.; HATTEL, A. L.; NAQI, S. A.; WILSON, R. A. Detection of viral antigen following exposure of one-day-old chickens to the Holland-52 strain of IBV. **Avian Pathol.**, v.20, n.4, p.663-673, 1991.

PARDO, J.; BOSQUE, A.; BREHM, R.; WALLICH, R.; NAVAL, J.; MÜLLBACHER, A.; ANEL, A.; SIMON, M.M. Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. **J Cell Biol.**, v.167, n.3, p.457-68, 2004.

PARK, S. S.; LILLEHOJ, H.S.; HONG, Y.H.; LEE, S.H. Functional characterization of tumor necrosis factor superfamily 15 (TNFSF15) induved by lipopolysaccharides and *Eimeria* infection. **Dev. Comp. Immunol**., v.31, p.934-944, 2007.

PEI, J.; SEKELLICK, M.J.; MARCUS, P.I.; CHOI, I.S.; COLLISSON, E.W. Chicken interferon type I inhibits infectious bronchitis virus replication and associated respiratory illness. **J. Interferon Cytokine Res.**, v.21, n.12, p.1071-1077, 2001.

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

SARSON, A. J.; ABDUL-CAREEM, M.F.; ZHOU, H.; SHARIF, S. Transcriptional analysis of host responses to Marek´s disease viral infection. **Viral Immunol.**, v.19, n.4, p.747-758, 2006.

SCOTT, T. R. Our current understanding of humoral immunity of poultry. **Poultry Science**, v.83, p.574-579, 2004.

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

SIDDEL, S.; WEGE, H.; MEULEN, V. T. The biology of coronaviruses. **J. Gen. Virol.**, v.64, n.4, p.761-776, 1983.

SIDDEL, S. Siddell S, Wege H, ter Meulen V. The structure and replication of coronaviruses. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v.99, p.131-163, 1982.

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, 1989. p.75-79.

STERN, D. F.; KENNEDY, S. I. T. Coronavirus multiplication strategy. I. Identification and characterization of virus specific RNA. **J. Virol**, v.34, n.3, p.665-674, 1980.

STERN, D. F.; SEFTON, B. M. Coronavirus proteins: biogenesis of avian infectious bronchitis virus proteins. **J. Virol.**, v.44, n.3, p.794-803, 1982.

STURMAN, L. S.; HOLMES, K. V. The molecular biology coronaviruses. **Adv. Virus Res.**, v.28, p.35-112, 1983.

STURMAN, L. S.; HOLMES, K. V.; BEHNKE, J. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. **J. Virol.**, v.33, p.449-462, 1980.

SUN, J.; MADAN, R.; KARP, C.L.; BRACIALE, T. J. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. **Nat. Med.**, v.15(3), p.277-84, 2009.

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

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**., v.41, n.2, p.379-87, 1997.

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

UBA. **Relatório anual da união brasileira de avicultura**. Disponível em: www.abef.com.br/portal/_clientes/abet/cat/Anuario_baixa_resolucao.pdf. Acesso em 18 dez. 2010.

VAN DOMMELEN, S.L., SUMARIA, N, SCHREIBER, R.D., SCALZO, A.A. SMYTH, M.J., DEGLI-ESPOSTI, M.A. Perforin and granzymes have distinct roles in defensive immunity and immunopathology. **Immunity** v.25, p.835–848, 2006.

VILLARREAL, L.Y.B.; SANDRI, T.L.; SOUZA, S.P.; RICHTZENHAIN, L.J. DE WIT, J.J.; BRANDAO, P.E. Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in breeders, broilers, and layers. **Avian dis.**, v. 54, p.894–898, 2010.

WANG, X. et al. Transcriptome of local innate and adaptative immunity during early phase of infectious bronchitis viral infection. **Viral Immunol**., v.19, n.4, p.768-774, 2006.

WANG, L.; JUNKER, D.; COLLISON, E. W. Evidence of natural recombination within the S1 gene of infectious bronchitis virus. **Virology**, Duluth, v.192, n.2, p.710-716, 1993.

WIGLEY, P. & KAISER, P. Avian cytokines in health and disease. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.5, n.1, p.1-14, 2003.

WINTER, C; Herrler, G.; Neumann, U. Infection of the tracheal epithelium by infectious bronchitis virus is sialic acid dependent. **Microbes Infect.**, v.10, n.4, p.367-73, 2008.

WINTERFIELD, R.W.; FADLY, A.M. Some characteristics of isolates of infectious bronchitis virus from commercial vaccines. **Avian Dis.**, v.16, n.4, p.746-55, 1972.

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

YU L., JIANG Y., LOW S., WANG Z., NAM S.J., LIU W. & KWANG J. (2001). Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens. *Avian Dis.*, **45**, 416–424.

XING, Z.; SCHAT, K. A. Expression of cytokine genes in Marek´s disease virus-infected chickens and chicken embryo fibroblast cultures. **Immunol.,** v.100, p.70-76, 2000.