

## DIFERENTES RESPOSTAS IMUNES LOCAIS INDUZIDAS APÓS DESAFIO COM ISOLADOS DE CAMPO BRASILEIROS DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS

C.H. Okino<sup>1\*</sup>, M.A.Z. Mores<sup>1</sup>, G.L.M. Mattos<sup>1</sup>, P.A. Esteves<sup>1</sup>, L. Brentano<sup>1</sup>, H.J. Montassier<sup>2</sup>, I.M. Trevisol<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Suínos e Aves – Laboratório de Sanidade e Genética Animal – Concórdia – SC- Brasil

<sup>2</sup>UNESP – Departamento de Patologia Animal - Laboratório de Imunologia e Virologia — Jaboticabal – SP- Brasil

### Introdução

A Bronquite Infecciosa das galinhas (BI), causada pelo vírus da BI (VBI), possui ocorrência mundial e é responsável por perdas de milhões de dólares anuais na produção de frangos, matrizes e postura. A replicação primária do VBI ocorre no epitélio traqueal, ocasionando uma série de alterações patológicas. Entretanto, os mecanismos envolvidos localmente na resposta imune e patogênese da BI permanecem não elucidados completamente. O objetivo desse trabalho foi o de avaliar comparativamente o perfil de expressão de genes envolvidos na resposta imune na traqueia de aves infectadas experimentalmente com isolados de campo brasileiros do VBI genotipados como “variantes”.

### Material e Métodos

Após sequenciamento e análise filogenética do gene S1 de amostras de VBI isolados no Brasil, foram selecionados os isolados F3715 e F3736 caracterizados como variantes brasileiras de campo, para utilização em estudos “in vivo”, conforme descrito a seguir. Treze aves SPF (“Specific Pathogen Free”) linhagem “White Leghorn”, alojadas em três isoladores com pressão positiva no primeiro dia de idade. Aos 39 dias de idade, 5 aves dos isoladores 1 e 2 foram desafiadas com  $10^{5.0}$  DI<sub>50</sub>/ave de F3736 e F3715, respectivamente, via óculo-nasal, enquanto 3 aves do isolador 3 receberam somente diluente do vírus do desafio (controle negativo). Aos 5 dias pós-infecção (dpi), todas as aves foram eutanasiadas e o terço proximal das traqueias removido. Parte da traqueia foi destinada à avaliação histopatológica e o restante à extração de RNA. O RNA extraído foi submetido à RT-PCR em tempo real para quantificação absoluta do gene S1 do VBI (carga viral) e para quantificação relativa da expressão de genes relacionados à resposta imune: inata (TLR3, TLR7, MYD88, IFN $\alpha$  e IFN $\beta$ ), inflamatória (IL1 $\beta$ , IL6, TBET e INOS) e mediada por células (CD4, CD8 $\beta$ , IL2, IFN $\gamma$  e Granzima homóloga A). Os resultados foram comparados pelo teste de Mann-Whitney, com nível de significância de  $P < 0,05$ .

### Resultados e Discussão

**Histopatologia** – Aumentos significativos dos escores de lesões traqueais foram observados em ambos os grupos desafiados, quando comparados ao grupo controle negativo, sendo levemente aumentados no grupo desafiado com F3715 (escore 11) em relação ao grupo desafiado com F3736 (escore 9).

**Carga viral** – Foram detectadas aproximadamente  $10^{6.37}$  e  $10^{5.94}$  cópias do gene S1 do VBI nos grupos F3736 e F3715, respectivamente.

**Imunidade inata** – Foram observados aumentos significativos da expressão gênica de TLR7 e IFN $\alpha$  somente no grupo desafiado com F3715 em relação ao grupo controle negativo. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quanto à expressão de IFN $\beta$  e MYD88. Transcritos de TLR3 foram significativamente aumentados no grupo desafiado com F3736 em relação ao controle negativo, enquanto o aumento observado no grupo desafiado com F3715 não foi significativo (provavelmente por elevada variação individual observada nesse grupo). Em

trabalho descrito anteriormente (2), após desafio com VBI, aumentos significativos de TLR7 e MYD88 na traqueia foram mais pronunciados no intervalo 1dpi, enquanto de TLR3 no 3dpi, nesse trabalho não houve alterações significativas para INOS e IFN $\alpha$ .

**Resposta inflamatória** – Somente o grupo desafiado com F3715 apresentou aumento significativo da expressão dos genes IL1 $\beta$  e IL6 em relação ao grupo negativo. O aumento da expressão de TBET foi significativo para ambos os grupos desafiados (F3736 e F3715), embora significativamente superior no grupo desafiado com F3715. A expressão gênica de INOS apresentou-se levemente reduzida nos grupos desafiados em relação ao grupo negativo, embora sem diferenças significativas. Resultados semelhantes foram observados por outros autores para IL1 $\beta$  aos 3 dpi com VBI (2). Além disso, aumento de IL6 nos rins foi previamente relacionado às lesões renais após infecção experimental com estirpe nefropatogênica de VBI (1).

**Imunidade mediada por células** – Foram observados aumentos significativos da expressão dos genes IFN $\gamma$ , CD8 $\beta$ , Granzima homóloga A e IL2 em ambos os grupos desafiados em relação ao grupo negativo, sendo a expressão dos genes CD8 $\beta$  e Granzima homóloga A significativamente superior no grupo desafiado com F3715. Transcritos de CD4 foram significativamente aumentados somente no grupo desafiado com F3715. Os aumentos de IFN $\gamma$  (11 vezes), CD8 $\beta$  (8,7 vezes) e Granzima homóloga A (20 vezes) observados no grupo desafiado com F3736, foram semelhantes aos descritos em aves desafiadas com estirpe de referência M41 do VBI (3), respectivamente de 6, 10 e 15 vezes, enquanto os aumentos desses transcritos observados no grupo desafiado com F3715 foram superiores (18, 50 e 240 vezes para os mesmos genes).

### Conclusões

Embora os escores de lesões microscópicas e valores de carga viral observados na traqueia em ambos os grupos desafiados apresentaram-se semelhantes, a expressão de genes relacionados à imunidade inata (TLR7 e IFN $\alpha$ ), à resposta inflamatória (IL1 $\beta$ , IL6 e TBET), e à resposta mediada por células (CD8 $\beta$ , Granzima homóloga A e CD4) foram significativamente superiores no grupo desafiado com F3715 quando comparados ao grupo desafiado com F3736, indicando distintas interações desses dois isolados de campo testados com o sistema imune inato e adquirido das mucosas do trato respiratório das galinhas e evidenciando a importância da realização de investigações adicionais para a caracterização imunobiológica de isolados de campo brasileiros, a fim de se identificar aqueles com maior imunogenicidade na formulação de novas vacinas para o controle da BI.

### Bibliografia

1. Asif, M. et al, *Viral Immunol.* 20(3):479-486. 2006
2. Kameka, A.M. et al, *Virology*. 450-451:114-121. 2014.
3. Okino, C.H. et al, *Viral Immunol.* 26(4):1-9. 2013

**Agradecimentos:** Aos funcionários que auxiliaram na execução desse experimento: Tânia Alvina Potter Klein, Altair Althaus, Dejalmo Alexandre da Silva, Franciele Janiski.