

PERFIL DE ATIVIDADE PRÓ-INFLAMATÓRIA E CITOLÍTICA APÓS DESAFIO COM O VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA

C.H. Okino^{1,2}, A.C. Alessi¹, I.L. Santos¹, M.F.S. Montassier¹, H.J. Montassier¹

¹Laboratório de Imunologia e Virologia – Departamento de Patologia animal – UNESP – Jaboticabal - SP

²Laboratório de Sanidade e Genética Animal – Embrapa Suínos e Aves – Concórdia – SC

Introdução

O papel das citocinas e outros mediadores de resposta inflamatória e/ou T-citolítica na patogênese da Bronquite Infecciosa das galinhas (BI) permanece pouco conhecido. Em razão de o local de replicação primária do vírus da BI (VBI) ser a mucosa traqueal, foi formulado o objetivo desse trabalho que é de avaliar o perfil de expressão gênica de citocinas e de outros marcadores de atividade pró-inflamatória ou T-citolítica nesse órgão, em diferentes intervalos após desafio com o VBI, a fim de se propor uma nova ferramenta para realização de testes de patogenicidade e de proteção vacinal comumente realizados para essa doença. Para validação dessa metodologia, os resultados obtidos foram comparados com lesões microscópicas, atividade ciliar e quantificação viral na traqueia, como sendo parâmetros quantitativos relativos às alterações patológicas ocasionadas pelo VBI.

Material e Métodos

Foram utilizados dois grupos de 25 aves SPF (Specific Pathogen Free) mantidos em isoladores com pressão positiva. Aos 21 dias de idade, cada ave do primeiro grupo recebeu $10^{4,0}$ DIE₅₀ da estirpe M41 do VBI via óculo-nasal. Cada ave do segundo grupo (controle) recebeu somente o diluente do vírus do desafio. Nos intervalos de 8 horas (h), 24h, 3 dias (d), 7d e 14 d pós-infecção (dpi) foram sacrificadas cinco aves por grupo. Amostras de traqueia foram divididas em três partes, uma porção foi submetida ao congelamento rápido para extração de RNA e subsequente RT-PCR em tempo real para quantificação da expressão gênica (atividade pró-inflamatória: IL1 β , IL6, TNFS15, anti-inflamatória: IL10 e TGF β , antiviral T-citolítica: IFN γ , Granzima homóloga A e marcador de linfócito T citotóxico CD8+) e da carga viral (gene S1), outra porção foi separada para processamento histopatológico e uma terceira porção foi imediatamente avaliada quanto à atividade ciliar. Para quantificação da expressão gênica foi utilizado como gene constitutivo (normalizador) o 18S, e a variação da expressão dos marcadores testados foi realizada referente ao grupo controle (Livak & Schmittgen,2001).

Resultados e Discussão

Os resultados da quantificação da expressão de genes associados às atividades pró-inflamatórias ou citolíticas na traquéia de aves desafiadas com a estirpe M41 do VBI estão apresentados na Figura 1, enquanto que os resultados relativos às alterações patológicas induzidas pelo VBI estão apresentados na Figura 2.

Foram observadas correlações positivas entre os três parâmetros relativos às alterações patológicas traqueais induzidas pelo VBI. Os níveis de expressão dos genes de IL6, IL10, IFN γ e Granzima homóloga A apresentaram correlação positiva significativa com os três parâmetros de alterações patológicas traqueais, sendo que a expressão do gene da Granzima homóloga A revelou os maiores coeficientes de correlação positiva com esses mesmos parâmetros. A quantificação de IL1 β demonstrou correlação positiva somente com a carga viral na traquéia. Já, a expressão de TNFS15 apresentou correlação negativa com os escores de ciliostase e de lesões histológicas.

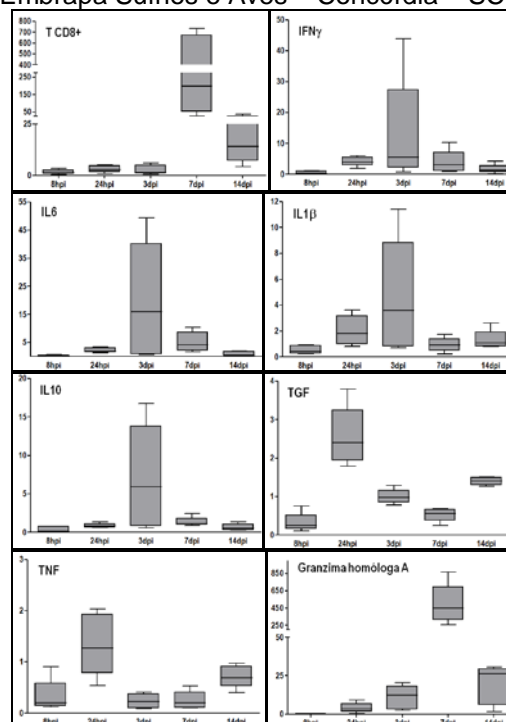


Figura 1. Gráficos com número de aumento de vezes da expressão gênica dos diferentes marcadores testados em amostras de traqueia de aves desafiadas com o VBI (eixo Y) nos diferentes intervalos avaliados (eixo X)

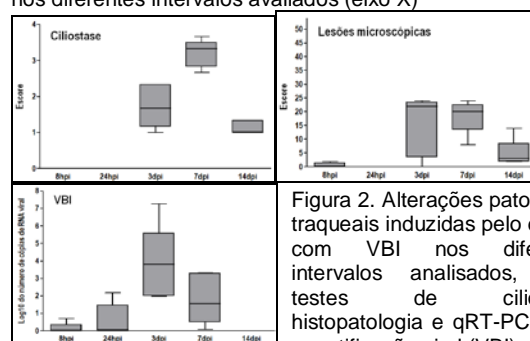


Figura 2. Alterações patológicas traqueais induzidas pelo desafio com VBI nos diferentes intervalos analisados, pelos testes de ciliostase, histopatologia e qRT-PCR para quantificação viral (VBI).

Conclusões

Os resultados indicam que os marcadores de resposta inflamatória e/ou T-citolítica selecionados nesse estudo podem desempenhar um papel importante na indução de lesões na traqueia ocasionadas pelo VBI, e os seus níveis de expressão gênica podem ser relacionados com as alterações patológicas na traquéia e, possivelmente, com uma maior susceptibilidade a infecções bacterianas secundárias. Essa metodologia, principalmente para quantificação da Granzima homóloga A, pode ainda ser utilizada como ferramenta para avaliação de patogenicidade e testes de proteção vacinal comumente aplicados para estudos de novos isolados desse vírus.

Bibliografia

1. Livak KJ, Schmittgen TD, Method. Methods 2001;25:402-408.

Agradecimentos:

Suporte financeiro: FAPESP (proc.07/55070-2) e CNPq (476120/2007-1).